

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS
BIOTECNOLÓGICAS**

PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERIA BIOTECNOLOGICA



**“CARACTERIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS,
INMOVILIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE
Cu (II) Y Cd (II)”**

Tesis presentado por las Bachilleres:

RONDAN ROSAS, CLAUDIA IBETH

ZEGARRA TUNI, FIORELA TATIANA

Para optar el Título Profesional de

INGENIERO BIOTECNÓLOGO

Asesor: Ing. Cinthia Córdova Barrios.

AREQUIPA – PERÚ

2014

DEDICATORIA

A Dios, por la vida, a mis padres (*Rigoberto y Eliana*) por su apoyo, cariño y comprensión, a Harry por sus oraciones y toda su ternura y a mis angelitos (*José y Evaristo*) que desde el cielo me acompañan todos los días y protegen mi caminar.

Claudia Ibeth Rondán Rosas

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis padres por estar presentes con sus consejos durante la realización de la tesis.
A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

Fiorela Tatiana Zegarra Tuni

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a Dios por brindarnos la vida, el entendimiento y fortaleza para concluir nuestra profesión, por no habernos permitido rendirnos en ningún momento e iluminarnos para salir adelante.

A la Universidad Católica de Santa María por ser nuestra alma mater para desarrollar y concluir nuestros estudios profesionales.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas por acogernos con cariño, por su esfuerzo y dedicación preocupándose de nuestras necesidades durante nuestra permanencia como alumnas.

Al Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica, a los docentes, técnicos y todo el personal que nos han impartido sus conocimientos preparándonos para enfrentarnos a los problemas laborales que encontraremos en nuestro desarrollo profesional.

A nuestros Sres. Jurados; Dra. Jesús Zambrano, Blgo. Iván Paz e Ing. Jaime Barreda por su asesoramiento en la corrección y el tiempo dedicado para la revisión y evaluación de nuestra tesis.

A nuestra asesora: Ing. Cinthia Córdova Barrios por su apoyo, consejos, conocimientos que sin duda han permitido que este trabajo se concrete correctamente.

Nuestro más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda desinteresada han colaborado en la realización, en especial al P. Walter por sus consejos y todo el ánimo que nos brindó alentándonos a continuar y finalizar el presente trabajo.

Un reconocimiento a las auxiliares de laboratorio Sra. Rocío y Sra. Luisa, por su ayuda, comprensión y sobretodo por habernos facilitado lo necesario en la elaboración de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTO	ii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN.....	17
VARIABLES E INDICADORES	19
OBJETIVOS.....	20
CAPÍTULO II.....	21
MARCO TEÓRICO	21
2.1. MICROORGANISMOS HALÓFILOS	21
2.1.1. CARACTERÍSTICAS:	22
2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS HALÓFILOS:	23
2.1.3. DESCRIPCION DE GENEROS BACTERIANOS.....	24
a) GAMMAPROTEOBACTERIAS.-	24
b) ACTINOBACTERIAS.-	25
2.2. EL CUARZO:.....	26
2.2.1. ORIGEN.-	26
2.2.2. DESCRIPCION.-	26
2.3. CONTAMINACION AMBIENTAL.-.....	27
2.3.1. CONTAMINACION POR METALES PESADOS:	28
2.4. METALES PESADOS.....	28
2.4.1. METALES PESADOS LIBRES AL AMBIENTE.-	29
2.4.2. FACTORES QUE CONDICIONAN LA ACUMULACIÓN Y DISPONIBILIDAD DE LOS METALES PESADOS EN EL SUELO.-	30
2.5. EL COBRE.-.....	32
2.5.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.-.....	32

2.5.2. COBRE Y ESTANDARES DE CALIDAD.-.....	32
2.5.3. DISTRIBUCION MEDIAMBIENTAL DEL COBRE.-	33
2.5.4. EFECTOS AMBIENTALES DEL COBRE.-.....	33
2.5.5. EFECTOS DEL COBRE SOBRE LA SALUD HUMANA.-	34
2.6. EL CADMIO.-.....	35
2.6.1. CARACTERISTICAS GENERALES.-.....	35
2.6.2. EL CADMIO Y ESTANDARES DE CALIDAD.-	35
2.6.3. DISTRIBUCION MEDIAMBIENTAL.-	36
2.6.4. EFECTOS AMBIENTALES DEL CADMIO:	36
2.6.5. EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA SALUD HUMANA:.....	37
2.7. LEGISLACION NACIONAL:.....	37
2.8. TRATAMIENTOS DE RESIDUOS CON METALES PESADOS.-	38
2.9. INMOVILIZACIÓN BACTERIANA.-	43
2.9.1. CARACTERISTICAS.-.....	43
2.9.2. TIPOS DE SOPORTE.-	44
2.9.3. VENTAJAS.-	45
2.10. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.-	45
2.10.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.-	45
2.10.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.-	46
CAPITULO III	49
MATERIALES Y METODOS.....	49
3.1. MATERIALES:.....	49
3.1.1. MATERIALES DE VIDRIO	49
3.1.2. REACTIVOS	49
3.1.3. INSUMOS.....	50
3.1.4. EQUIPOS.....	50
3.2. MÉTODOS.-.....	50
3.2.1. LUGAR DE EJECUCION.-	50
3.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.-	51

3.4. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DEL SUELO.	51
3.4.1. MÉTODO CONDUCTIMÉTRICO.-.....	51
3.4.2. DETERMINACIÓN DE SALES DISUELTAS TOTALES (SDT) SEGÚN LA FÓRMULA DE MARRION BABCOCK.-	52
3.4.3. MEDIDA DE% DE CLORUROS.-	53
3.4.4. DETERMINACIÓN DE CONDICIONES METEREOLÓGICAS.-	53
3.5. SIEMBRA Y CULTIVO DE BACTERIAS.-	54
3.5.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA CULTIVOS MADRES.- ..	54
3.5.2. SIEMBRA Y CULTIVO DE PLACAS MADRE.-	54
3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.-.....	55
3.6.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.-55	
3.6.2. CARACTERIZACION MICROSCOPICA DE LAS CEPAS.-	56
3.7. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO.-	57
3.7.1. FACTOR: SALINIDAD.-.....	57
3.7.2. FACTOR: pH.-.....	57
3.7.3. FACTOR: TEMPERATURA.-.....	58
3.8.CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS:	58
3.9.DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.- ...	63
3.10. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cu (II) y Cd (II). -	65
3.10.1. MÉTODO DE INMOVILIZACION EN ALGINATO DE CALCIO.-.....	65
a)MEDIDA DE LA REMOCION DE METALES PESADOS DE Cu (II) y Cd (II).-	66
b)ANALISIS ESTADISTICO	66
CAPITULO IV	69
RESULTADOS Y DISCUSION	69
4.1. RECOLECCION DE MUESTRAS:	69
4.2. EVALUACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DEL SUELO.-....	72

4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD.-	72
4.2.2. DETERMINACIÓN DE SALES DISUELTAS TOTALES (SDT) SEGÚN LA FÓRMULA DE MARION BABCOCK (1976).-.....	73
4.2.3. MEDIDA DE % DE CLORUROS.-	74
4.2.4. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES METEREOLÓGICAS, MEDIANTE SOFTWARE “SURFACEMETEOROLOGY AND SOLAR ENERGY”.-	75
4.3. SIEMBRA Y CULTIVO DE BACTERIAS:	77
4.3.1. TRATAMIENTO DE LAS PIEDRAS PARA CULTIVOS MADRES.-.....	77
4.3.2. SIEMBRA Y CULTIVO DE PLACAS MADRE.	77
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.-.....	81
4.4.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.-81	
4.4.2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS	86
4.5. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO..	87
4.5.1. FACTOR: <i>SALINIDAD</i> .-	88
4.5.2. FACTOR: <i>pH</i> .-.....	89
4.5.3. FACTOR: <i>TEMPERATURA</i> .-.....	90
4.6.CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS.-	91
4.7. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO:....	92
4.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cu (II) Y Cd (II), MEDIANTE INMOVILIZACIÓN EN ALGINATO.-	95
4.8.1. EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS Cu (II) Y Cd (II).-.....	95
a)Remoción de Cu (II) 10 ppm.-	95
b)Remoción de Cd (II) 10 ppm.-	97
c)Comparación de remoción de Cu (II) y Cd (II) 10 ppm.-	99
d)Remoción de Cu (II) 100 ppm.-	100
e)Remoción de Cd (II) 100 ppm.-	102
f) Comparación de remoción de Cu (II) y Cd (II) 100 ppm.-	104

CAPITULO V	106
CONCLUSIONES.....	106
RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXO 1.-	117
OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE CEPAS ELIMINADAS. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO: DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.- SALINIDAD:	117
ANEXO 2.-	118
EVALUACIÓN DE LA SALINIDAD DEL SUELO EN BASE A LA CONDUCTIVIDAD	118
ANEXO 3.-	118
ESTANDARIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA 0,1 N CON CLORURO DE SODIO 0,1 N	
ANEXO 4.-	120
PREPARACION DE SOLUCIONES	120
ANEXO 5.-	120
INMOVILIZACION BACTERIANA.....	120
ANEXO 6.-	122
RESUMEN ESTADISTICO TEST T Student	122
ANEXO 7.-	122
RESUMEN ESTADISTICO ANOVA.....	122

INDICE DE FIGURAS

Fig. N°1. Mecanismos de tolerancia de las células bacterianas a los metales pesados.	25
Fig. N°2. Formas de distribución de metales pesados contaminantes tóxicos.	29
Fig. N°3. Gradiente de pH en suelos y movimiento de iones.	31
Fig. N°4. Representación esquemática de los procesos involucrados en la fitoextracción de metales desde los suelos.	34
Fig. N° 5.- Bioacumulación de metales pesados.	41
Fig. N° 6. Bioadsorción de metales pesados.	41
Fig. N°7. Zonas de acumulación de metales pesados, Fitorremediación.	42
Fig. N°8. Espectros de Absorción.	45
Fig. N° 9. Componentes básicos de un espectrofotómetro.	46
Fig. N° 10. Esquema de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica.	47
Fig. N° 11. Representación de una Curva de Crecimiento Bacteriana y sus fases.	64
Fig. N°12. Vista general del sitio de muestreo de la Mina no Metálica en el distrito de Uchumayo-Región Arequipa.	69
Fig. N° 13. Piedras y Cuarzos encontrados para el muestreo.	70
Fig. N°14. Piedras de cuarzo para obtención de bacterias, A.- piedra blanca con coloración café; B.- piedra blanca con coloración verde-turquesa y C.- piedra café con coloración café.	71
Fig. N° 15. Vista de Google Maps de la zona Muestreada ($16^{\circ} 21' 17.48''$ S, $71^{\circ} 36' 09.03''$ O).	71
Fig. N°16. Resultados de % Cloruros según el Método de Volhard.	75
Fig. N° 17. Vista del software utilizado para determinar las condiciones ambientales.	76
Fig. N°18. Datos de radiación solar, humedad, presión atmosférica, velocidad del viento, de la zona muestreada.	76

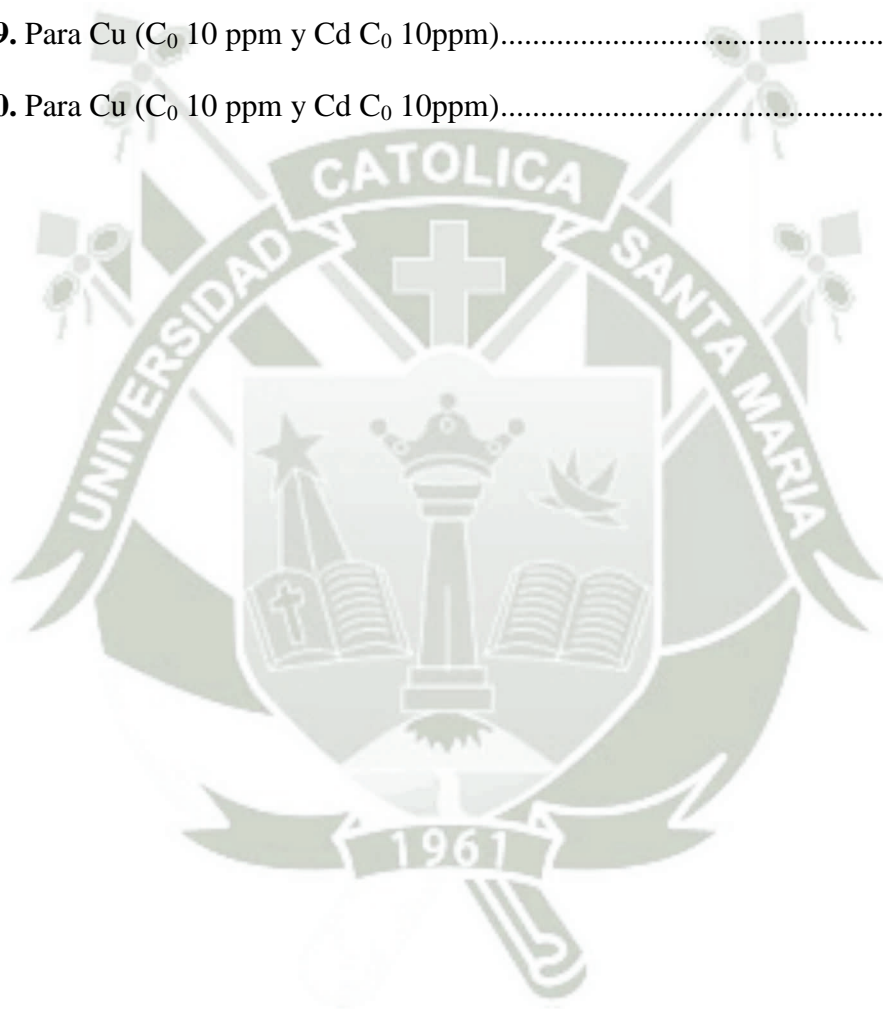
Fig. N°19. Tratamiento de las piedras extraídas de minas no metálicas de Uchumayo para obtención de cultivos madres.	77
Fig. N°20. Cultivo madre de la muestra CMB.	78
Fig. N°21. Cultivo madre de la muestra CMV.	79
Fig. N°22. Cultivo madre de la muestra de CMC.	79
Fig. N°23. Placa control, se sembró esta placa para poder corroborar la asepsia del aislamiento.....	81
Fig. N°24. Cultivo en medio PTYG de cepa CMB-N.	84
Fig. N°25. Cultivo en medio PTYG de cepa CMV-E.	85
Fig. N°26. Cultivo en medio PTYG de cepa CMC-E.	85
Fig. N°27. Observación 100 x, Coloración de Gram; muestras CMB-N.	86
Fig. N°28. Observación 100 x, Coloración de Gram; muestras CMV-B	86
Fig. N° 29. Curva de Crecimiento CMB-N	93
Fig. N°30. Curva de Crecimiento de la cepa CMV-B	94
Fig. N°31. Grafica de disminución PPM de Cu (II) a través del tiempo.....	96
Fig. N° 32. Grafica de disminución PPM de Cd (II) a través del tiempo.	98
Fig. N° 33. Grafica comparativa de Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de C ₀	99
Fig. N° 34. Grafica de disminución PPM de Cu (II) a través del tiempo.	101
Fig. N° 35. Disminución de ppm de Cd (II) a través del tiempo (días)	103
Fig. N°36. Grafica comparativa de Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de C ₀	104
Fig. N°37. Crecimiento de las todas las Cepas aisladas a Temperatura de 4°C.	117
Fig. N°38. Temperatura 55°C de cepas CMB-B, C, E; CMV- A, B Y CMC-B, C.	117
Fig. N°39. Fotografía de las todas las cepas aisladas, a pH 9, cara frontal e inversa.....	117
Fig. N°40. Formación de perlas de alginato en CaCl ₂	120
Fig. N°41. Cultivo de consorcios con contaminante en agitación.....	120

Fig. N°42. Consorcio en medio líquido de cultivo con contaminante Cd (II) 10 ppm.....	121
Fig. N°43. Consorcio en medio líquido de cultivo con contaminante Cu (II) 10 ppm.	121
Fig. N°44. Gráficos de Frecuencia para Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de Concentración inicial	124
Fig. N°45. Gráfico de Cajas y Bigotes para Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de Concentración inicial.	125
Fig. N°46. Gráficos de Frecuencia para Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de Concentración inicial	126
Fig. N°47. Gráfico de Cajas y Bigotes para Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de Concentración inicial	127
Fig. N°48. Gráfico de Cajas y Bigotes para los 4 tratamientos Cu (II) 10 y 100 ppm Cd (II) 10 y 100 ppm	127

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Variables e indicadores de trabajo.....	19
Tabla N° 2. Clasificación de halófilos en función de la salinidad.	23
Tabla N°3. Clasificación de agua de acuerdo al uso.....	32
Tabla N° 4. Técnicas físicas para la eliminación de metales de efluentes.	39
Tabla N° 5. Técnicas químicas para la eliminación de metales de efluentes.....	39
Tabla N°6. Comparación entre polímeros naturales y polímeros sintéticos, usados en la inmovilización microbiana, aplicado en el tratamiento de aguas residuales domésticas.	44
Tabla N°7. Longitudes de onda y sensibilidades en absorción atómica.....	48
Tabla N°8. Resultados de la Conductividad	72
Tabla N°9. Categoría de Salinidad de Suelos.....	72
Tabla N°10. Tabla de datos de Concentración de SDT	73
Tabla N°11. Resultado de % de Cloruros	75
Tabla N°12. Denominación de cepas aisladas	77
Tabla N°13. Reporte de crecimiento de placas madre.....	78
Tabla N°14. Caracterización Macroscópica de las Cepas aisladas.....	82
Tabla N°15. Caracterización Macroscópica de cepa CMB.	82
Tabla N°16. Caracterización Macroscópica de cepa CMV.	83
Tabla N°17. Caracterización Macroscópica de cepa CMC.	83
Tabla N°18. Cuadro resumen de identificación diferencial GRAM.....	87
Tabla N°19. Tabla de resultados de las condiciones óptimas respecto a la salinidad a diferentes rangos de tratamiento.....	88
Tabla N°20. Resultados para condiciones óptimas de pH	89
Tabla N°21. Tabla resumen de resultados a diferentes pH y temperatura.....	90
Tabla N°22. Pruebas Bioquímicas para las cepas en estudio.	91

Tabla N°23. Tabla de Absorbancias de las cepas CMB-N y B-CMV	92
Tabla N°24. Tabla de datos de la remoción de Cu (II) (C_0 10 ppm)	95
Tabla N° 25. Tabla de datos de la remoción de Cd (II) (C_0 10 ppm).....	97
Tabla N° 26. Tabla de datos de la remoción de Cu (II) (C_0 100 ppm).....	100
Tabla N° 27. Tabla de datos de la remoción de Cd (II) (C_0 100 ppm).....	102
Tabla N°28. Ajuste de la conductividad en función de la solución de KCl.....	118
Tabla N°29. Para Cu (C_0 10 ppm y Cd C_0 10ppm).....	123
Tabla N°30. Para Cu (C_0 10 ppm y Cd C_0 10ppm).....	125



LISTA DE ABREVIACIONES:

- Cu II: Cobre metálico
- Cd II: Cadmio metálico
- Hg: Mercurio
- Pb: Plomo
- Ni: Níquel
- Sb: Antimonio
- Bi: Bismuto
- ppm: Partes por millón
- NaCl: Cloruro de sodio
- CaCO_3 : Carbonato de calcio
- Na_2CO_3 : Carbonato de sodio
- ECA: Estándares de Calidad Ambiental
- SDT: Sales disueltas totales
- CE: Conductividad eléctrica
- CMV: Cepa Madre Verde
- CMC: Cepa Madre Café
- CMB: Cepa Madre Blanca

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la capacidad de remoción de Cu (II) y Cd (II) por cepas bacterianas halotolerantes aisladas de piedras de cuarzo provenientes de terrenos áridos-salinos del distrito de Uchumayo de Arequipa e inmovilizadas por el método de gelificación ianotrópica.

Se determinó las condiciones físico-químicas del suelo de la zona de muestreo, conductividad, sales disueltas y porcentaje de cloruros, factores meteorológicos como humedad, radiación solar y temperatura mediante el Software “Surface Meteorology And Solar Energy”.

De las cepas bacterianas aisladas se determinó sus condiciones óptimas de crecimiento con respecto a variaciones de pH, encontrándose el óptimo a 7 (*neutrófilas*), salinidad a 7% (*halotolerantes moderados*) y temperatura a 37 °C (*mesófilas*).

Se realizó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas bacterianas aisladas y a través de su caracterización bioquímica se identificó las cepas dentro de los géneros de *Corynebacterium spp* y *Pseudomona aeruginosa*.

Para la evaluación de la capacidad de remoción de Cu (II) y Cd (II), se inmovilizó el consorcio conformado por las cepas bacterianas de *Corynebacterium spp* y *Pseudomona aeruginosa* en alginato de calcio al 2.5% y se determinó el porcentaje de remoción en 10 ppm y 100 ppm de las soluciones de Sulfato de Cobre (CuSO_4) y Nitrato de Cadmio $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ respectivamente, tomando muestras cada 3 días, por duplicado durante 15 días; estas fueron analizadas por Espectroscopia de Absorción Atómica, obteniendo los siguientes porcentajes de remoción, para el Cobre (II) a 10 ppm 97.08% y a 100 ppm 62.7%; para el Cadmio (II) a 10 ppm 99.0% y a 100 ppm 10.1% lo que demuestra que el consorcio bacteriano inmovilizado presenta la capacidad de remoción de dichos metales pesados.



ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the removal capacity of Cu (II) and Cd (II) by halotolerant bacterial strains isolated from quartz stones from arid - saline soils Uchumayo district of Arequipa and immobilized by the method of ianotrópica gelation.

Physico-chemical soil sampling zone conditions, conductivity, dissolved salts and percentage of chlorides, meteorological factors such as humidity, solar radiation and temperature was determined by the Software "Surface Meteorology and Solar Energy".

Strains isolated from their optimal growth conditions are determined with respect to pH variations, being the optimum to 7 (neutrophils), salinity to 7 % (moderate halotolerant) and temperature at 37 ° C (mesophilic).

Macroscopic and microscopic characterization of bacterial isolates and through its biochemical characterization identified strains within the genera *Corynebacterium* spp and *Pseudomona aeruginosa* was performed.

To evaluate the ability of removal of Cu (II) and Cd (II) , the consortium of bacterial strains of *Corynebacterium* spp and *Pseudomona aeruginosa* in calcium alginate immobilized 2.5% and the percentage of removal was determined in 10 ppm and 100 ppm solutions of copper sulfate (CuSO_4) and nitrate Cadmium $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, respectively , taking samples every 3 days , in duplicate for 15 days , and these were analyzed by Atomic Absorption Spectroscopy , obtaining the following percentages clearance for the copper (II) at 10 ppm and 100 ppm 97.08 % 62.7 % , for cadmium (II) at 10 ppm and 100 ppm 99.0 % 10.1 % showing that the immobilized bacterial consortium has the capacity to remove these heavy metals.

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados presentes en efluentes son producto de actividades industriales y agrícolas, tales como la fabricación de pigmentos, la utilización de fertilizantes y pesticidas, entre otros; estos se han convertido en un serio problema en los ecosistemas y en la salud del hombre. ⁽⁶⁶⁾

A diferencia de otros tipos de compuestos que contaminan el medio ambiente, la dificultad para removerlos radica en la imposibilidad última de su destrucción o biodegradación, debido a su naturaleza química. ⁽¹⁷⁾

En los últimos años se han desarrollado diversas investigaciones que proponen alternativas para prevenir y restaurar los daños ocasionados por el crecimiento industrial. La biotecnología, mediante el uso de microorganismos, aporta posibilidades para inmovilizar los metales en formas no biodisponibles y/o convertir los iones metálicos tóxicos en formas químicas más inocuas, además de ser tecnologías de bajo costo y accesibles. ⁽⁶⁴⁾

En el presente trabajo de investigación se propone utilizar bacterias halófilas nativas, como especies biorremediadoras de lechos contaminados, para la remoción de metales pesados, como el cobre y cadmio.

El interés de estas cepas bacterianas se incrementa notablemente aprovechando las propiedades y características particulares en medios extremos como en condiciones normales, para que puedan ser utilizadas en forma individual o en consorcios, por lo que su aplicación es adecuada, económica y representan una importante alternativa a los tratamientos convencionales que presentan desventajas en términos energéticos o de costo.

HIPÓTESIS

“Dado que cepas bacterianas halófilas han mostrado adaptación en ambientes extremos, es probable que sean resistentes a la toxicidad de metales pesados y tengan la capacidad de remoción de Cu (II) y Cd (II) en sistemas de inmovilización con alginato de calcio”

VARIABLES E INDICADORES

Tabla N°1. Variables e indicadores de trabajo

VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADORES
Piedras de cuarzo	Coloración
Salinidad	Concentración de NaCl (%)
pH	Concentración de H^+
Temperatura	°C
Cu (II)	Concentración de Sulfato de cobre (ppm)
Cd (II)	Concentración Nitrato de cadmio (ppm)
VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES
Cepas nativas	Presencia de cepas
Crecimiento bacteriano	UFC/mL
	Densidad Óptica
Remoción de Cu (II) y Cd (II)	ppm

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

1. Caracterizar cepas bacterianas halófilas, inmovilizar y evaluar la capacidad de remoción de Cu (II) y Cd (II).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Aislar e identificar cepas bacterianas halófilas, procedentes de muestras de cuarzo en suelos áridos de minas no metálicas del distrito de Uchumayo-Arequipa.
2. Determinar las condiciones óptimas de Salinidad, Temperatura y pH para el crecimiento de cepas bacterianas halófilas.
3. Inmovilizar en alginato de calcio las cepas bacterianas en sus respectivas condiciones óptimas.
4. Evaluar la capacidad de remoción de Cu (II) de bacterias halófilas inmovilizadas en alginato de calcio.
5. Evaluar la capacidad de remoción de Cd (II) de bacterias halófilas inmovilizadas en alginato de calcio.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. MICROORGANISMOS HALÓFILOS

La elevada diversidad microbiana se debe a diversos factores ambientales, incluyendo la conservación geológica a través de los años, la heterogeneidad de los terrenos, los cambios ambientales y finalmente el conjunto de adaptaciones a las condiciones extremas. Es conocido que los ambientes que hasta hace poco eran considerados inhabitables por el hombre, son colonizados por determinados organismos capaces de adaptarse a esos nichos ecológicos, conocidos como ambientes extremos.

El cloruro de sodio ($NaCl$), es uno de los factores que ha contribuido en esta diversidad microbiana. A pesar de que este compuesto es un inhibidor para el crecimiento de microorganismos, algunos de ellos han desarrollado diversos mecanismos de adaptación.

El término halófilo viene del griego “*halo*”–sal y “*filio*”–amante. Los microorganismos halófilos evolucionaron bajo condiciones que imperaban en la tierra primitiva: alta temperatura, salinidad y atmósfera inestable.⁽¹⁹⁾

Los ambientes hipersalinos son en general medios inhóspitos para los seres vivos. El problema más importante que encuentran los microorganismos ordinarios en este tipo de ambientes, es la pérdida de agua citoplasmática debido a la elevada osmolaridad del medio, en estos ambientes coexisten grupos filogenéticos muy diferentes, sin embargo su distribución no es precisamente homogénea sino que existe un claro predominio de unos grupos frente a otros dependiendo del grado de salinidad del medio.⁽²⁸⁾

Las bacterias halófilas son microorganismos que requieren cierta concentración de $NaCl$ para su desarrollo y crecimiento. Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren.⁽⁸³⁾ Estos se encuentran en ambientes hipersalinos y son capaces de reproducirse y realizar sus funciones metabólicas de una manera más eficaz en presencia de

altas concentraciones de sales; tienen la capacidad de balancear su presión osmótica en relación con el medio y resistir los efectos nocivos de la sal. ⁽⁶⁰⁾.

Entre los microorganismos halófilos estudiados existen individuos pertenecientes a los tres dominios: *Eukarya*, *Bacteria* y *Arqueas*, sin embargo dependiendo de la concentración de sal del medio, la abundancia de unos a otros varía considerablemente. ⁽⁹²⁾.

2.1.1. CARACTERISTICAS:

Los microorganismos halófilos están ampliamente distribuidos en los medios hipersalinos (en zonas áridas hipersalinas, costas, diferentes profundidades del agua de mar, etc.).

Dado que las membranas biológicas son permeables al agua, las células no pueden mantener la actividad del agua en su citoplasma más alta que su alrededor; porque ello las puede llevar a perder agua hacia el medio que las rodea. Por consiguiente, se puede esperar que un microorganismo que vive en altas concentraciones de sal mantenga su citoplasma al menos isosmótico con el medio extracelular. La presencia de una presión de turgencia requiere un citoplasma hiperosmótico. ⁽⁴¹⁾.

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. ⁽⁵⁹⁾. Una de las ventajas que le conceden los exopolisacáridos a las bacterias halófilas es la capacidad de captar metales pesados.

Los géneros predominantes que se han identificado del suelo no son muy variables en comparación a los encontrados en muestras de aguas hipersalinas; así se han identificado los géneros *Bacillus spp.*, *Halomonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Micrococcus spp.*, *Pediococcus halophylus* y en menor proporción *Nesterenkonia* y *Agrobacterium.*, además de diversas especies de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. paraheamolyticus*, *V. vulnificus*). En cuanto a los hongos son importantes *Aspergillus penicillioides* y *Aspergillus terreus*. ⁽¹⁰⁵⁾.

2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS HALÓFILOS:

Kushner y Kamekura (1988), propusieron categorías de microorganismos dependiendo de la concentración de *NaCl* que requieren para su crecimiento óptimo, esto es considerando que el agua de mar contiene una concentración de *NaCl* cerca del 3% p/v.⁽⁴⁸⁾ La clasificación se muestra en la *Tabla N° 2*.

Tabla N° 2. Clasificación de halófilos en función de la salinidad.

HALÓFILOS	CONCENTRACIONES DE NaCl
Halófilos Extremos	2,5-5,2 M (saturación de NaCl)
Halófilos Moderados	0,5-2,5 M (aprox. 3-15% p/v)
Halófilos Débiles	0,2 a 0,5M (aprox. 1-3% p/v)

Fuente: Kamekura, 1988.

Los microorganismos halófilos extremos son comunes de ambientes hipersalinos que presentan una concentración de sal superior a 2,5M de *NaCl* (15% p/v), las especies de los géneros *Halobacterium* y *Halococcus* son ejemplo de ello y con frecuencia producen pigmentos rosados o rojos.⁽²⁸⁾

Las bacterias halófilas moderadas a concentraciones salinas intermedias 0,5 – 2.5 M de *NaCl* (3 – 15%. p/v) pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter* y *Moraxella*.⁽⁵⁶⁾

Aquellas bacterias, entre las que se encuentran las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter*, crecen mejor en medios con una concentración de sal comprendida entre 0.2 – 0.5 M de *NaCl* (0.5- 3.0% p/v), y son consideradas débilmente halófilas.

Otras bacterias son *halotolerantes*; es decir, son capaces de crecer en medios con sal o sin sal, generalmente suelen crecer a 1 M de *NaCl* (5% o más de sal); entre las mismas

se incluyen ciertas especies de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* y *Clostridium*, *Sarcinas*, *Pseudomonas*, *Pediococcus* y *Alcalígenes*.⁽²⁸⁾

2.1.3. DESCRIPCION DE GENEROS BACTERIANOS

a) GAMMAPROTEOBACTERIAS.-

Constituyen el subgrupo más grande de proteobacterias comprendidas por bacterias Gram-negativas fermentadoras y facultativamente anaerobias e incluyen una gran variedad de tipos fisiológicos.⁽¹⁴⁾

Dentro de este clase, se encuentran algunos géneros que han sido registrados como tolerantes a la salinidad, *Halomonas spp.*, *Pseudomona spp.*, *Marinomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Alteromonas spp.* y *Marinococcus spp.*⁽⁹⁹⁾.

- ***Pseudomona aeruginosa***, es un bacilo Gram-negativo aerobio, no formador de esporas, puede presentar de 1.5 a 5 µm de largo y, un diámetro de 0.5 a 1.0 µm. Las especies de este género son móviles, debido a la presencia de uno o más flagelos polares. La mayoría de células de *P. aeruginosa* presentan un único flagelo polar. La movilidad les permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis), así como localizar substratos en bajas concentraciones.⁽⁷⁴⁾

Es un género de especies capaces de utilizar un amplio rango de compuestos, tanto orgánicos como hidrocarburos alifáticos y aromáticos e inorgánicos, capaces de vivir bajo muy diversas condiciones ambientales. Debido a estas características, podemos encontrarlos tanto en los ecosistemas terrestres como acuáticos.

Estas cepas son frecuentemente resistentes a antibióticos, desinfectantes, detergentes, metales pesados y solventes orgánicos. Por consiguiente, contribuyen de manera significativa a la remoción de estas sustancias químicas.⁽⁹⁶⁾

En la **Fig.N°1**. Se observa los mecanismos de tolerancia de *Pseudomona aeruginosa* a los metales pesados a través de la adherencia a la membrana célula o su reducción a estados menos tóxicos.

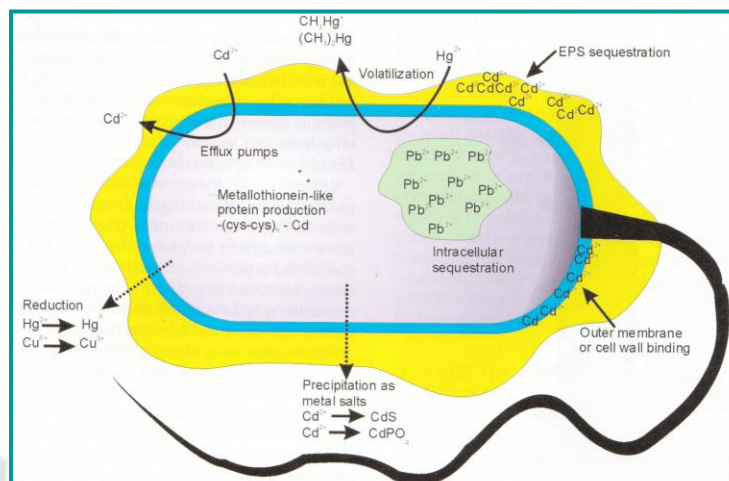


Fig. N°1. Mecanismos de tolerancia de las células bacterianas a los metales pesados.

Fuente: Field, 2006. *Biorremediación de metales Pesados*. Universidad de Arizona, Ingeniería Química y Ambiental.

b) ACTINOBACTERIAS.-

El filo Actinobacteria es un grupo de bacterias de distribución mundial, muy abundantes en suelos y ambientes acuáticos. Son bacterias Gram-positivas, algunas especies son capaces de producir esporas externas, heterótrofas aerobias y anaerobias facultativas, tienden a crecer lentamente formando filamentos ramificados.

Son conocidas por las sustancias químicas que algunas de sus especies son capaces de producir, las cuales han sido explotadas por las industrias farmacéuticas para la producción de medicamentos. ⁽⁴⁴⁾.

Dentro de esta clase, los géneros registrados como bacterias halófilas y halotolerantes son *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* y *Streptomyces spp.* ⁽⁹⁹⁾.

- *Corynebacterium spp.*, son bacterias Gram-positivas, catalasa positivas, no esporuladas, carecen de motilidad, bacilos rectos o ligeramente curvados cuyo tamaño oscila entre 2-6 μm de longitud y 0,5 μm de diámetro, a menudo con la típica forma de V (lo que también se denomina “forma de letras chinas”), aunque también aparecen formas elipsoidales, son aerobias o anaerobias facultativas, quimio-organotrofos.

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza encontrándose en el suelo, el agua, productos alimenticios y también la mucosa del hombre. ⁽²³⁾.

Las especies no patógenas, son utilizadas en procesos industriales de gran relevancia, como la producción de aminoácidos y la degradación de hidrocarburos. ⁽²⁵⁾. En algunos estudios se reportó la resistencia a algunos metales pesados, como es el caso de *Corynebacterium genitalium spp.*, que presenta resistencia a mercurio y plomo, y *Corynebacterium diptheriae spp.*, que ha sido aislado de suelos contaminados con cromo (IV). ⁽⁹³⁾. Investigaciones en el oeste de China, ha registrado que la especie, *Corynebacterium halotolerans spp.*, resiste una concentración salina de 10 % de sales como NaCl , KCl y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. ⁽²⁰⁾.

2.2. EL CUARZO:

2.2.1. ORIGEN.-

Proviene de rocas sedimentarias, metamórficas, e ígneas. Es un mineral muy común encontrado en todo el mundo, se encuentra en el ambiente geológico y es un componente de casi todos los tipos de roca. Es con frecuencia el mineral primario al 98%. ⁽³⁹⁾.

2.2.2. DESCRIPCION.-

De fórmula empírica: SiO_2 y peso molecular de 60.08 g/mol. Su composición química corresponde a 46.74 % de silicio y 53.26 % de oxígeno.

Su textura suele ser sacaroidea, que se caracteriza por presentar un mosaico de cristales que recuerdan a un terrón de azúcar, con predominio de los colores claros (incolores, blanca, rosada, gris, entre otros). ⁽⁴³⁾.

El tamaño de los cristales varía entre los especímenes que pesan una tonelada hasta las partículas diminutas que centellean sobre las superficies rocosas, también es común en formas masivas que contienen partículas con tamaños desde granulado grueso hasta criptocristalino (granos invisibles para el ojo, pero observables con un microscopio). Tiene una dureza de 7 y una densidad relativa de 2,65. Su brillo es vítreo en algunos especímenes y graso en otros. El mineral puro es incoloro, pero es frecuente que esté teñido por impurezas. ⁽⁷⁶⁾.

2.2.3. USOS.-

De las muchas variedades cristalinas del cuarzo las distintas formas de calcedonia se usan como gemas y otros ornamentos. Las rocas de cristal puro se utilizan en equipos ópticos y electrónicos. Como arena, el cuarzo se utiliza con profusión en la fabricación de vidrio y de ladrillos de sílice, o como cemento y argamasa. El cuarzo molido sirve de abrasivo en el cortado de piedras, en los chorros de arena y en el molido de vidrio. El cuarzo en polvo se usa para hacer porcelana, papel de lija y relleno de madera. Se utilizan grandes cantidades de cuarzo como fundente en operaciones de fundición. ⁽⁷⁶⁾.

2.3. CONTAMINACION AMBIENTAL.-

Según la legislación ambiental vigente, se define como contaminación al hecho de *“alterar nocivamente la pureza o las condiciones normales de una cosa o un medio por agentes físicos y químicos”*. La Base Normativa en la que aparece esta definición y sus aplicaciones en la Ley N° 26842; Ley General de Salud en su capítulo VIII, artículo. 106 señala que: *La Autoridad de Salud establecerá las medidas de prevención y control indispensables para que cesen los actos de contaminación ambiental que ponga en riesgo la salud de la población.*

La OMS considera que la contaminación, tanto en espacios interiores como al aire libre, constituye un grave problema de salud medioambiental que afecta a los países desarrollados y en desarrollo por igual. También considera que la contaminación atmosférica constituye un riesgo medioambiental para la salud y se estima que causa alrededor de dos millones de muertes prematuras al año en todo el mundo. ⁽⁶²⁾.

2.3.1. CONTAMINACION POR METALES PESADOS:

Debido a las actividades económicas, de producción y de desarrollo en nuestro país entre los principales agentes contaminantes identificados tenemos: el plomo, mercurio, aluminio, arsénico, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cianuro, agregándose a estos metales pesados el dióxido de azufre, y el ácido sulfúrico. (R.M. N° 525-2005/MINSA).

Adicionalmente a ello tenemos la presencia cada vez mayor de poblaciones ubicadas dentro del área de influencia de las actividades productivas entre ellas la minería. El mayor conocimiento sobre el impacto ambiental y los riesgos a la salud ocasionados por los diferentes metales pesados y otras sustancias químicas generó la preocupación del Ministerio de Salud por las formas de proteger a las poblaciones en riesgo y enfrentar los problemas existentes, creando mediante R.M. N° 425-2008-MINSA, la Estrategia Sanitaria Nacional de Atención a Personas Afectadas por Contaminación con Metales Pesados y otras Sustancias Químicas, dependiente de la Dirección General de Salud de las Personas con funciones definidas. ⁽⁶²⁾.

En la ciudad de Arequipa el daño que se causa a los suelos es de la misma magnitud al de agua y aire, algunas veces es menos evidente; sin embargo, es importante conocer los lugares donde es más probable que se contamine el suelo. Algunos de estos sitios son: los basureros municipales, las zonas urbanas muy pobladas, etc., sin dejar de mencionar las zonas agrícolas donde se utilizan los fertilizantes o pesticidas de manera excesiva. ⁽²⁷⁾.

2.4. METALES PESADOS

De los elementos químicos que hoy conocemos, aproximadamente un 75 % son metales. Se va a definir metal pesado de acuerdo a la Norma Técnica Ambiental dictada bajo el amparo de la Ley de Gestión Ambiental y del Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental, son: *“Metales de número atómico elevado, presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para los seres humanos, están distribuidos a lo largo de la corteza terrestre como cadmio, cobre, cromo,*

hierro, manganeso, mercurio, níquel, plomo, y zinc, entre otros, que son tóxicos en concentraciones reducidas y tienden a la bioacumulación”⁽⁶²⁾.

Los Metales pesados son aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua. Los más importantes son: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn) y aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 (Cu) y 200.59 (Hg).⁽³²⁾.

2.4.1. METALES PESADOS LIBRES AL AMBIENTE.-

En la Fig. N°2., se muestra la disposición de los metales pesados en el suelo y las formas de contaminación.

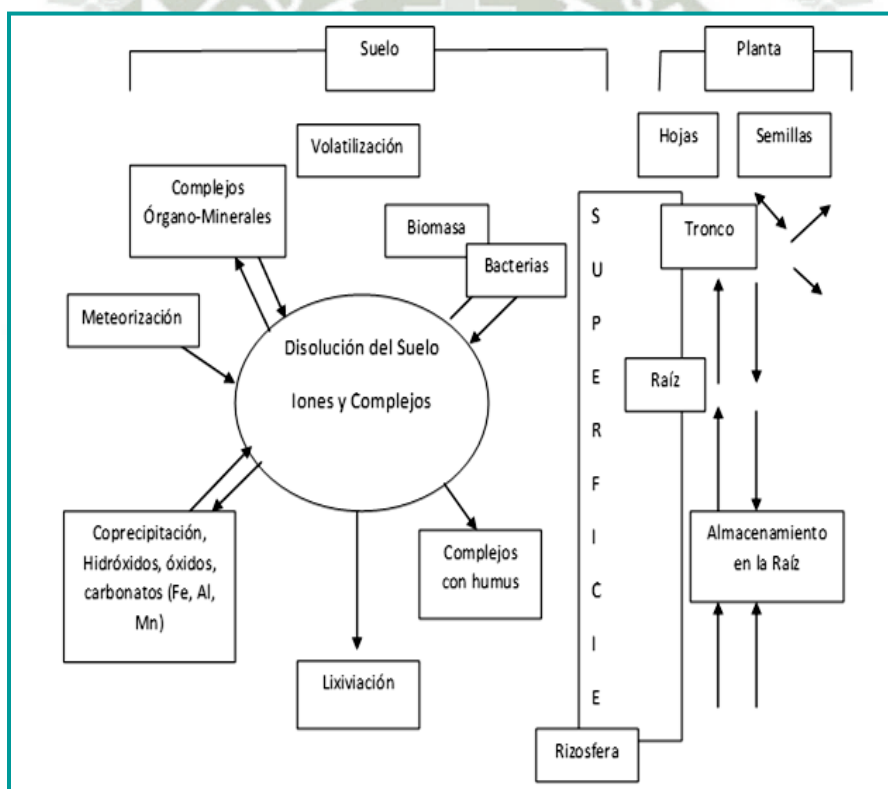


Fig. N°2. Formas de distribución de metales pesados contaminantes tóxicos.

Fuente: AbouSeoud. (2003). *Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped Pseudomonas sp.* Z Naturforsch, 58(9-10), 726-31.

La peligrosidad es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Metales pesados sin función biológica conocida, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos conllevan a disfunciones en el funcionamiento de sus organismos, resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son, principalmente: Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi.

Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación. Uno de los mecanismos mediante el cual los metales llegan al ser humano se debe a que las plantas absorben el metal a través de la raíz y a su vez las especies animales lo hacen al alimentarse de aquellas.⁽²⁷⁾

2.4.2. FACTORES QUE CONDICIONAN LA ACUMULACIÓN Y DISPONIBILIDAD DE LOS METALES PESADOS EN EL SUELO.-

- **Temperatura.-** Ha mostrado incrementar la velocidad y la cantidad de metales absorbidos por las partículas del suelo. Al mismo tiempo, la captación de metales por las plantas se ha informado que aumenta con el incremento de la temperatura. Esto puede ser explicado por el hecho, de que el crecimiento de la raíz es a menudo limitado por bajas temperaturas del suelo (temperatura por debajo de lo normal) y altas (temperatura por encima de lo normal), indicando que por encima o debajo de la temperatura optima se redujo el crecimiento de la raíz, esto viene a ser importante para la captación de metales por las plantas. En un estudio realizado se informó que el aumento de la temperatura incrementó la retención de Cd y Zn en el suelo, pero que la captación de la planta también se incrementó.⁽⁴⁾
- **Salinidad.-** El aumento de la salinidad puede incrementar la movilización de algunos metales pesados, niveles elevados de cloruro en agua incrementan la solubilidad de Cd (es decir forma complejos solubles estables con el metal), y otros metales (Zn, Hg) presentes en el suelo, lo cual incrementa su captación por las plantas.⁽⁸⁸⁾

- **pH del suelo.**- Es un factor esencial, ya que determina la solubilidad, valores por encima de la neutralidad, reducen la movilidad de los metales pesados.

En la **Fig. N° 3**, se observa la interacción que, cuando el pH del suelo disminuye, la solubilidad de los metales tiende a incrementarse.

La presencia de carbonatos condiciona el pH del suelo. El CaCO_3 lo mantiene en torno a 8.0 - 8.2 y el Na_2CO_3 entre 10 - 10.5. En estos rangos la mayoría de metales tiende a precipitar. Los fertilizantes de N y P reducen el pH. ⁽⁸⁸⁾.

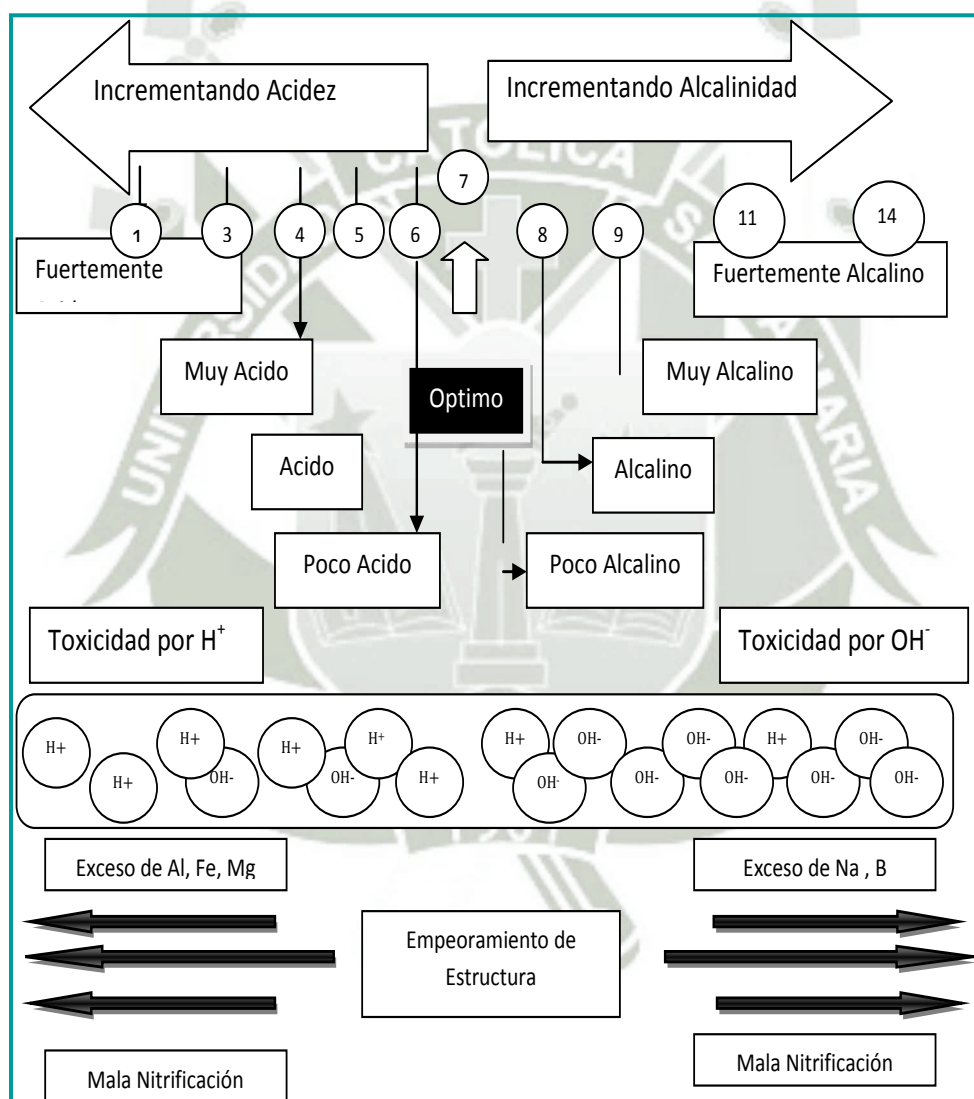


Fig. N°3. Gradiente de pH en suelos y movimiento de iones.

Fuente: Quero Consulting SC, 2013

2.5. EL COBRE.-

2.5.1. CARACTERISTICAS GENERALES.-

El cobre es un metal rojo, pardusco, dúctil y maleable, de número atómico 29, masa atómica 63.54. Es un excelente conductor de energía eléctrica y térmica. Es la materia prima más común en la fabricación de cables telefónicos y del desarrollo de nuevas tecnologías para aumentar la eficiencia en la transmisión de datos. ⁽²⁴⁾.

En agricultura se utiliza en forma de fertilizantes, bactericidas, fungicidas, como algicidas para la purificación de aguas y aditivo para piensos. ⁽⁵⁾.

2.5.2. COBRE Y ESTANDARES DE CALIDAD.-

Según los Estándares de Calidad Ambiental, la concentración de 0.2 ppm es la permisible, son principalmente producidas por vertimientos industriales y mineros. En el caso de aguas se dividen de acuerdo al destino de uso.

En la **Tabla N° 3**, se muestra la clasificación de agua, para el consumo humano, tomando en cuenta los valores permisibles, para cada caso. ⁽¹⁰⁾

Tabla N°3.Clasificación de agua de acuerdo al uso.

CLASIFICACIÓN	A1	A2	A3
USO	Para uso superficial que pueden ser potabilizadas con desinfección.	Para uso superficial que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional.	Para uso superficial que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado.
VALOR DE Cu SEGÚN OMS	El valor es 0.003 mg/L.	El valor es 0.003 mg/L	El valor es 0.001 mg/L.
TRATAMIENTO	Simple desinfección.	Coagulación, floculación, filtración sedimentación, y desinfección.	Percolación, coagulación, filtración, microfiltración desinfección, carbón activado, ósmosis inversa, etc.

Fuente: Autoridad Nacional del Agua, A. (2012). *Monitoreo de la Calidad de Agua Cuenca Quilca-Chili-Arequipa.*

2.5.3. DISTRIBUCION MEDIAMBIENTAL DEL COBRE.-

El cobre se puede encontrar en minerales como calcopirita, se puede hallar en dos formas iónicas Cu^+ y Cu^{2+} que son relativamente intercambiables. Es absorbido como catión divalente Cu^{2+} en suelos aireados, es absorbido como Cu^+ en suelos con poco oxígeno mucha agua. Puede estar formando complejos con compuestos orgánicos. ⁽⁹⁸⁾.

Las formas predominantes del cobre en el agua mar, son las asociaciones complejas de Cu^{2+} con hidróxidos y carbonatos, en condiciones aeróbicas y también como catión libre. Esta última fracción tiende a asociarse mayoritariamente a la materia orgánica disuelta (MOD) y particulada (MOP) disminuyendo con ello su disponibilidad ambiental como catión libre. ⁽³⁷⁾.

2.5.4. EFECTOS AMBIENTALES DEL COBRE.-

Puede incorporarse al medio ambiente a través de minas de cobre, fábricas que manufacturan o usan cobre metálico o compuestos del mismo, basurales, del agua residual doméstica, de la combustión de desperdicios y combustibles fósiles, de la producción de madera, de la producción de abonos de fosfato y de fuentes naturales (por ejemplo, polvo en el aire, desde el suelo, volcanes, vegetación en descomposición, incendios forestales y de la espuma del mar).

Por lo tanto, el cobre está ampliamente distribuido en el medio ambiente, aproximadamente $1,4 \times 10^8$ libras (64×10^{10} g.) fueron liberadas al ambiente por industrias en el año 2000.

Cuando se libera al suelo, puede adherirse fuertemente a la materia orgánica y a otros componentes (por ejemplo, arcilla, arena, etc.) en las capas superficiales del suelo y no se moviliza muy lejos.

Cuando se liberan al agua, el cobre que se disuelve puede ser transportado en el agua de superficie ya sea en la forma de compuestos o libre siendo más probable unido a partículas suspendidas en el agua. Aun cuando se adhiere fuertemente a partículas en suspensión o a sedimentos, hay evidencia que sugiere que algunos de los compuestos solubles entran al agua subterránea. ⁽⁷⁰⁾

El cobre elemental no se degrada en el ambiente, se puede encontrar en plantas, la **Fig. N°4**, describe la disponibilidad de los metales en diversas partes de estas como los brotes o las raíces.

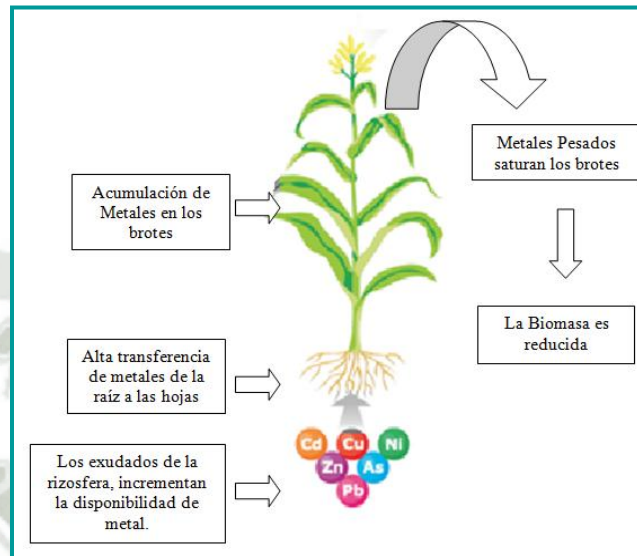


Fig. N°4. Representación esquemática de los procesos involucrados en la fitoextracción de metales desde los suelos.

Fuente: <http://www.cochilco.cl/quienes/>

También se encuentra en una variedad de concentraciones en muchas bebidas y alimentos, incluso en el agua potable.

Cuando los suelos de las granjas están contaminados con cobre, los animales pueden absorberlo y dañan su salud, principalmente las ovejas sufren un gran efecto por envenenamiento debido a que los efectos se manifiestan a bajas concentraciones.⁽⁴⁰⁾

2.5.5. EFECTOS DEL COBRE SOBRE LA SALUD HUMANA.-

La exposición profesional al cobre puede ocurrir en el ambiente de trabajo al contacto puede llevar a contraer gripe conocida como la “fiebre del metal”. Esta pasará después de dos días y es causada por una sobre sensibilidad.

Exposiciones de largo periodo pueden irritar la nariz, la boca y los ojos y causar dolor de cabeza, de estómago, mareos, vómitos y diarreas.

Una dosis elevada puede causar daño hepático, a los riñones e incluso la muerte. Si es cancerígeno no ha sido determinado aún. ⁽⁷⁰⁾.

2.6. EL CADMIO.-

2.6.1. CARACTERISTICAS GENERALES.-

El cadmio de número atómico 48, masa atómica 111,40 g/mol, se obtiene como subproducto del tratamiento metalúrgico de zinc y plomo, a partir de sulfuro de cadmio; en el proceso hay formación de óxido de cadmio, compuesto muy tóxico.

Además de contaminar el ambiente desde su fundición y refinación, también lo hace por sus múltiples aplicaciones industriales. Usos tan diversos y su larga vida media no permiten el reciclaje, por lo que se acumula progresivamente en el ambiente. ⁽⁸⁴⁾.

2.6.2. EL CADMIO Y ESTANDARES DE CALIDAD.-

Según los Estándares de Calidad Ambiental las concentraciones de 0.005 ppm son las permisibles, estas cuando van en aumento son consideradas como contaminantes, el cadmio es utilizado básicamente en cromados, lo que representa un 35 % del uso total, como pigmento (sobre todo en cerámica) y esmaltes, (sobre un 25 %), como estabilizante de plásticos (un 15 %), en baterías y en aleaciones (un 15 %).

Las sales de cadmio son venenosas, y por ello no son utilizadas en medicina. De la cantidad utilizada, menos de un 10% del cadmio es reciclado por la industria, lo que implica que la mayor parte se acumula en el medio ambiente. ⁽⁷⁰⁾.

Nivel máximo de concentración de cadmio en agua potable es 0,0005 ppm. (EPA, 2013). El nivel máximo de concentración de cadmio en agua fresca (fluida) es 0,0043 ppm. ⁽²⁹⁾.

De uso para riego en vegetales de tallo alto y tallo bajo, los parámetros establecidos para cadmio son 0.005 ppm, y de bebida de animales los parámetros establecidos son 0.01 ppm. En ambos casos los parámetros indicados son obligatorios, existen otros que son referenciales, pero para el caso del cadmio estos valores son obligatorios y son tomados como referencia. ⁽³¹⁾.

En lagos y lagunas el valor referencial presente y admisible es 0.004 ppm, en ríos de la costa y sierra es 0.005ppm. ⁽²⁹⁾.

2.6.3.DISTRIBUCION MEDIAMBIENTAL.-

En la naturaleza se le encuentra asociado al zinc, cobre y plomo, presenta gran afinidad por el azufre, de allí que su compuesto natural más común en el CdS. Su ión monoatómico más estable es Cd^{2+} .

El cadmio (como óxido, cloruro o sulfato) se encuentra en el aire en forma de partículas o vapores (proveniente de procesos de alta temperatura). Puede ser transportado largas distancias en la atmósfera para ser depositado sobre la superficie del suelo o del agua.

El cadmio y sus compuestos pueden movilizarse a través del suelo, pero su movilidad depende de varios factores tales como el pH y la cantidad de materia orgánica, los que varían según el ambiente local. Se adhiere fuertemente a la materia orgánica en la cual permanece inmóvil en el suelo y puede ser incorporado por plantas, entrando así a la cadena alimentaria. Puede encontrarse asociado a compuestos de zinc. Existe en forma de ion hidratado o como complejo iónico asociado a otras sustancias inorgánicas u orgánicas. ⁽⁸⁾.

2.6.4.EFECTOS AMBIENTALES DEL CADMIO:

En lo ambiental, es un elemento relativamente raro en la litosfera. Por afinidad química se encuentra junto al zinc, en proporción muy variable. Las principales fuentes de contaminación son: minero-metalurgia de metales no ferrosos, la metalurgia del hierro y acero, la fabricación de fertilizantes fosfatados, la incineración de residuos de madera, carbón o “plásticos”, la combustión de aceite y gasolina.

La concentración en aire de áreas industriales varía de 9,1 a 26,7 mg/m^3 frente a 0,1 a 6 ng/m^3 en el aire de áreas rurales. El tiempo de permanencia en suelos es de hasta 300 años y el 90 % permanece sin transformarse, llegando a terrenos agrícolas por deposición aérea (41%), con los fertilizantes fosfatados (54 %), por aplicación de abono de estiércol (5%) y, en el Perú, frecuentemente por efluentes que contienen residuos

líquidos y sólidos de plantas hidro-metalúrgicas de cadmio. Se ha encontrado que, en suelos contaminados, los niveles alcanzan valores de hasta 1mg de Cd/g y el agua de ríos contaminados puede contener hasta 0,14 mg de Cd por L. ⁽⁸⁴⁾.

2.6.5.EFECTOS DEL CADMIO SOBRE LA SALUD HUMANA:

La absorción percutánea ocurre solamente por contacto directo con los compuestos orgánicos, aumenta en sangre sólo los primeros 6 meses y luego sus niveles son proporcionales a la concentración en el ambiente laboral. Se encuentra también en páncreas, pulmón, corazón y músculos. Elevadas concentraciones en un tejido inferen concentración alta en otros, lo que nos lleva a afirmar que la distribución se determina sólo por el nivel ambiental de Cd y no por alguna función especial. ⁽⁸⁴⁾.

El agua con concentraciones muy altas de cadmio irrita el estómago, produciendo vómitos y diarreas, cuando es absorbido por el cuerpo humano produce descalcificación de los huesos, ocasionando que se vuelvan quebradizos y en dosis altas ocasiona la muerte. ⁽⁴⁶⁾. En exposiciones laborales, la inhalación es la ruta principal de ingreso y la absorción a partir de esta vía depende del tipo de compuesto inhalado, las partículas depositadas en la nasofaringe, tráquea y bronquios son transportadas por mecanismo mucociliar a la faringe, desde donde son parcialmente ingeridas y de ellas aproximadamente el 60 % pasa a la sangre. ⁽⁸³⁾.

2.7. LEGISLACION NACIONAL:

En el Perú se encuentran reglamentados los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) de metales pesados que debe tener un efluente antes de ser descargado en cuerpos receptores de agua. Estos varían dependiendo de la actividad industrial. Los podemos también encontrar en las diferentes legislaciones peruanas como se indican:

- Ley N° 28611 - Ley General del Ambiente.
- Ley N° 28245 - Ley Marco del Sistema Nacional de Gestión Ambiental.

- Ley N° 26821 - Decreto Supremo N° 044-98-PCM, que aprueba el Reglamento de los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental y Límites Máximos Permisibles.
- Políticas en materia de Recursos Naturales Renovables (Ministerio de Agricultura).
- Política en materia Sanitaria (Ministerio de Salud-DIGESA).
- Ley de Recursos Hídricos y su Reglamento N° 29338-2010 MINAM.
- Ley N° 26842-2007 - Ley General de Salud.
- Resolución Ministerial N° 480-2010/MINSA; donde aprueba la NTS N° 068-MINSA/DGSP-V.1, "Norma Técnica de Salud que establece el Listado de Enfermedades Profesionales".
- Resolución Ministerial N° 425-2008/MINSA, que establece la Estrategia Sanitaria Nacional de Atención a Personas Afectadas por Contaminación con Metales Pesados y Otras Sustancias Químicas, cuyo órgano responsable es la Dirección General de Salud de las Personas.

Para el caso de los metales en estudio se tomó de referencia el Decreto Supremo N°010-2010-MINAM, que regula los límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicas. Esta es la norma que rige en todo el país, para los LMP de concentración de Cd, Cu, Zn y otros metales efluentes. ⁽²⁷⁾.

2.8. TRATAMIENTOS DE RESIDUOS CON METALES PESADOS.-

2.8.1.METODOS FISICOS.-

Los métodos físicos tradicionales de tratamiento de efluentes industriales suelen tener una aplicación restringida por razones técnicas o económicas. Algunos se detallan en la **Tabla. N° 4**. Se sabe que pierden efectividad a concentraciones bajas, en estos casos, se suele utilizar el intercambio iónico o la adsorción. ⁽⁴⁷⁾.

Tabla N° 4. Técnicas físicas para la eliminación de metales de efluentes.

MÉTODO	DESVENTAJAS	VENTAJAS
ÓSMOSIS INVERSA	Altas presiones, alto coste energético. Caro.	Efluente puro (permitiría ser reciclado).
INTERCAMBIO IÓNICO	Sensible a las partículas. Resinas caras.	Efectiva. Efluente puro, es posible recuperar el metal.
ADSORSIÓN	No para metales.	Tecnología convencional. Adsorbente (carbón activo).
EVAPORACIÓN	Requiere mucha energía.	Efluente puro

Fuente: Mata. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. Universidad de Granada, Tesis Doctoral; ISBN.*

2.8.2. METODOS QUIMICOS.-

En la **Tabla N° 5**, se detalla las principales técnicas químicas, aunque teniendo en cuenta términos medioambientales, se deben considerar las técnicas de concentración, ya que los contaminantes normalmente no se destruyen sino, que se modifica su estado físico lo que implica su insolubilización y por tanto su fácil retirada del medio acuoso. ⁽⁴⁷⁾.

Tabla N° 5. Técnicas químicas para la eliminación de metales de efluentes.

MÉTODO	DESVENTAJAS	VENTAJAS
PRECIPITACIÓN QUÍMICA Y FILTRACIÓN	Separación difícil para altas concentraciones.	Simple, barata.
OXIDACIÓN QUÍMICA O REDUCCIÓN	Se necesitan reactivos químicos. Sensible a la temperatura.	Mineralización.
TRATAMIENTOS ELECTROQUÍMICOS	Requiere de altas concentraciones. Caro.	Permite la recuperación de metales.

Fuente: Mata. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger. Universidad de Granada, Tesis Doctoral; ISBN.*

Los tratamientos químicos se definen como procesos industriales cuyo objeto es la eliminación de los contaminantes presentes en fase acuosa mediante la adición de reactivos, cuyo objetivo es conseguir un efluente con la calidad requerida para su vertido y concentrar los contaminantes en una fase sólida (lodos) que debe ser gestionada correctamente.

2.8.3.METODOS BIOTECNOLOGICOS.-

Las interacciones metal-microbiota son estudiadas en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Ambos son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos.⁽¹⁰⁶⁾ Estos fenómenos son: biosorción, bioacumulación y biomineralización mediada por microorganismos.⁽³⁴⁾

a) BIOSORCIÓN.-

Proceso que puede ser definido como la captación de contaminantes desde una solución acuosa por un material biológico a través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos. Como los metales pesados pueden llegar a tener efectos letales en la biomasa viva, esta tiene la capacidad de poner en funcionamiento ciertos mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales.⁽⁸⁶⁾ Los dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales pesados por parte de la biomasa son:

- BIOACUMULACIÓN.-

Basada en la absorción de las especies metálicas mediante los mecanismos de acumulación al interior de las células de biomasa vivas.⁽⁸⁶⁾

Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. ⁽³⁴⁾. Este proceso se muestra en la **Fig. N°5**. Algunos ejemplos son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomona aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromyces cerevisiae*.

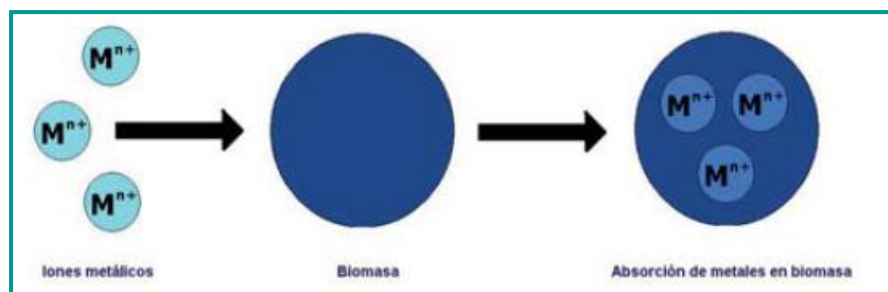


Fig. N° 5.- Bioacumulación de metales pesados.

Fuente: Reyes. (2006). *Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. Ingenierías, IX (31), 59-64.*

- BIOADSORCIÓN.-

Basada en la adsorción de los iones en la superficie de la célula. El fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática. ⁽³⁴⁾. En la **Fig. N°6**, se explica gráficamente la adsorción a la superficie de la biomasa.

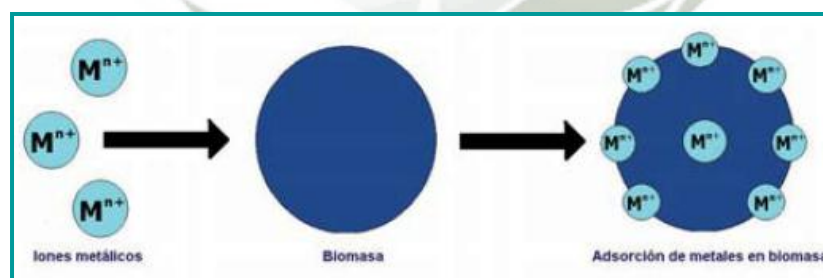


Fig. N° 6. Bioadsorción de metales pesados.

Fuente: Reyes. (2006). *Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. Ingenierías, IX (31), 59-64.*

b) FITORREMEDIACIÓN.-

El término fitorremediación hace referencia a una serie de tecnologías que se basan en el uso de plantas para limpiar o restaurar ambientes contaminados, como aguas, suelo se incluso aire.

La fitorremediación es eficaz solo cuando la concentración de contaminantes es reducida y requiere que éstos se encuentren en la rizosfera, a la profundidad que puedan llegar los sistemas radiculares de las plantas. ⁽⁵²⁾. En la **Fig. N° 7**, se muestran las principales zonas de acumulación, como las raíces, las hojas y/o brotes.

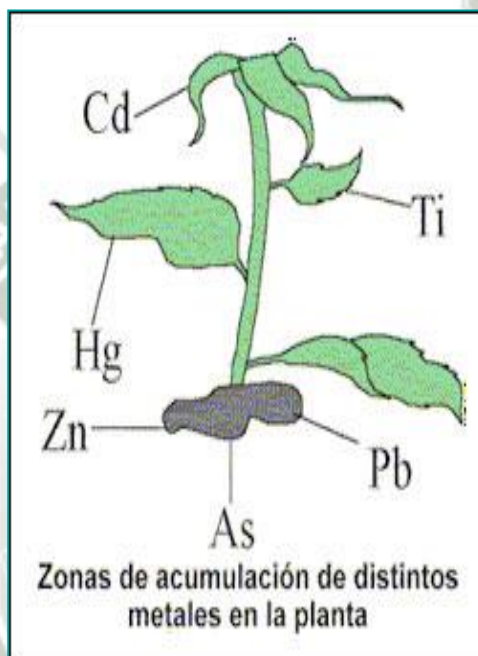


Fig. N°7. Zonas de acumulación de metales pesados, Fitorremediación.

Fuente: Lopez, L. (2012). *Fitorremediación*. Pontificia Universidad Javeriana, *Microbiología Ambiental*.

Las raíces extraen los contaminantes, que son introducidos en sus tejidos junto con el agua y las sales minerales necesarias para el desarrollo de los vegetales. Los contaminantes se transforman por la acción del metabolismo vegetal en otras moléculas de menor toxicidad o son oxidadas en su totalidad y liberadas a la atmósfera en forma de gases de la respiración.

Los microorganismos rizoferiscos degradan y secuestran contaminantes, tales como *Thlaspi eruslescens*, *Viola calaminaria*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea* y *Shewanella putrefaciens*.⁽¹⁸⁾.

2.9. INMOVILIZACIÓN BACTERIANA.-

2.9.1. CARACTERÍSTICAS.-

Puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada.⁽⁴⁹⁾.

Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares o a sustancias que estos mismos segregan de forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles.⁽²⁶⁾.

Bajo muchas condiciones las células inmovilizadas tienen ventajas sobre las células libres y las enzimas inmovilizadas. Su uso permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la velocidad de crecimiento empleada, la estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada.

Para lograr una inmovilización eficaz para el proceso, se deben tener en cuenta que los espacios que se usarán como soporte de inmovilización cumplan con parámetros como la presencia de una superficie de adherencia amplia, que sea de fácil operación, debe tener buena porosidad con el fin de permitir un intercambio constante de sustratos, productos, gases, etc., buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica, así como resistente a enzimas, solventes o cambios de presión.

En cuanto a las células a inmovilizar, afirman que estas deben ser viables y deben mantener un metabolismo activo por periodos largos, así como su metabolismo no debe verse afectado por los procesos de inmovilización.⁽⁶⁹⁾.

2.9.2. TIPOS DE SOPORTE.-

Diferentes soportes de inmovilización son utilizados. En la *Tabla N° 6.*, se muestra una comparación de los más utilizados.

Tabla N°6.- Comparación entre polímeros naturales y polímeros sintéticos, usados en la inmovilización microbiana, aplicado en el tratamiento de aguas residuales domésticas.

Características	Polímeros naturales		Polímeros sintéticos		
	Carragenano	Ca -alginato	PVA	PCS	PEG
Solubilidad	Alto	Alto	Bajo/nulo	Bajo/nulo	Bajo/nulo
Biodegradabilidad	Posible	Posible	Bajo	Bajo	Bajo
Estabilidad	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Medio
Difusibilidad	Muy bueno	Muy bueno	Bueno	Moderado	--
Crecimiento	Bueno	Bueno	Moderado	Moderado	Bueno
Proceso de inmovilización	Simple	Simple	Laborioso	Laborioso	Laborioso

Fuente: Manohar. (2001). *Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of Pseudomona spp. strain NGK1 in polyurethane foam. Appl. Microbiol. Biotechno*, 55(3), 311-6.

- El poliuretano al igual que el polivinil, son materiales ampliamente usados gracias a su resistencia a condiciones ambientales diferentes. Otros ejemplos son, la espuma de poliuretano para la inmovilización de *Protothecazopfii*, en la degradación de hidrocarburos, en la inmovilización de *Pseudomonas esterophilus*.
- El uso de carbón activado y de una membrana de polímero sintético con el fin de inmovilizar *Pseudomona putida*, aislada de suelo contaminado.⁽⁵⁴⁾.
- En investigaciones con alginato de calcio, se ha reportado que la disminución del pH al interior de las perlas de alginato de calcio, permite un aumento en el metabolismo celular. La disminución del pH se debe a que la membrana citoplasmática incrementa la permeabilidad a protones, permitiendo que se dé un consumo superior de ATP, lo cual se ve reflejado en el incremento del metabolismo.⁽³⁸⁾.
- Otro compuesto usado para la inmovilización de microorganismos por atrapamiento, es el agar, este puede ser usado en esferas o en fibras.⁽⁵⁴⁾.

2.9.3. VENTAJAS.-

La inmovilización de microorganismos en diversos soportes que van desde los biodegradables como residuos orgánicos o agroindustriales, hasta aquellos de difícil o nula degradación como plásticos y fibras de vidrio han permitido el interés y el desarrollo de nuevas tecnologías, debido a algunas ventajas que presentan como son:

- Concentración de biomasa.
- Actividad metabólica.
- Resistencia a la toxicidad.
- Estabilidad.
- Elevada densidad celular.
- Elevadas tasas de conversión.
- Limitación de la inhibición por sustrato y toxicidad debido a límites disfuncionales.
- Uso en reactores continuos. ⁽²⁾.

2.10. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.-

2.10.1. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.-

La espectroscopia UV-Visible estudia el fenómeno de absorción de la radiación UV-Visible de moléculas orgánicas e inorgánicas.

En la **Fig. N°8**, se muestra que la región visible, a la que es sensible el ojo humano, se localiza entre los 380 y 780 nm. ⁽⁹⁰⁾.

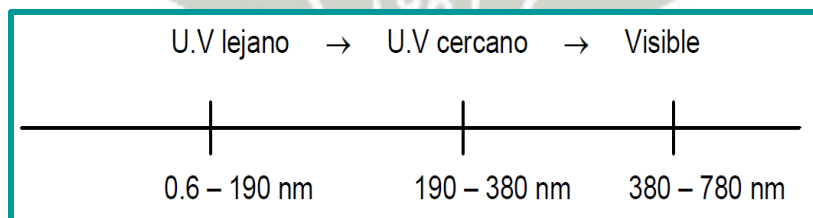


Fig. N°8. Espectros de Absorción.

Fuente: Téllez, M. (2008). *Laboratorio de equilibrio y cinética*.

La absorción de la radiación ultravioleta o visible por moléculas orgánicas e inorgánicas, se produce por la excitación de los electrones de enlace, por lo tanto, la longitud de onda de los máximos de absorción se puede relacionar con los enlaces de las especies absorbentes. Los métodos espectroscópicos se basan en la capacidad de las sustancias de absorber (o emitir) radiación electromagnética. Éstos se pueden emplear para determinar la concentración de un reactivo o producto durante una reacción.

En la **Fig. N° 9**, se observa los componentes básicos de un espectrofotómetro, que realizan el siguiente procedimiento para el análisis, el aparato detecta la cantidad de luz transmitida o absorbida a través de la solución en la celda y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia denominada “blanco”, la lectura en la escala ya está convertida en absorbancia.⁽⁹⁵⁾

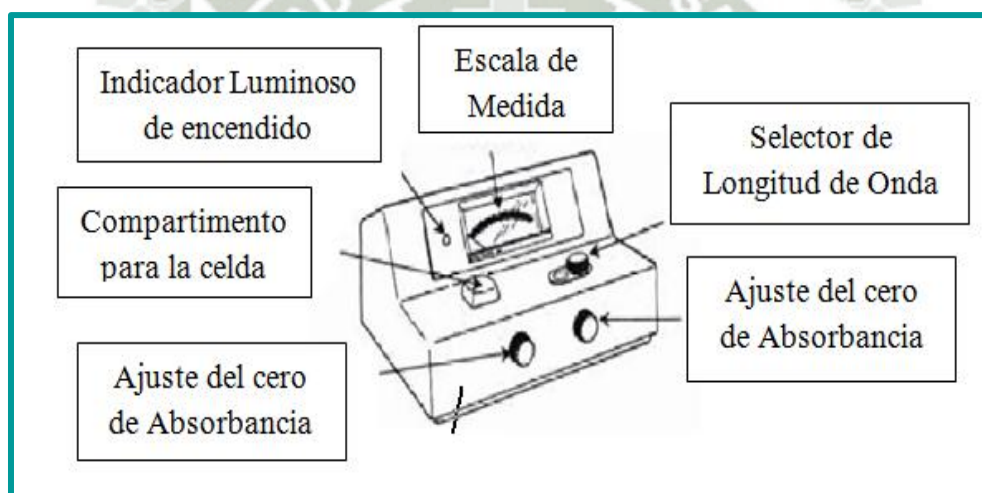


Fig. N° 9. Componentes básicos de un espectrofotómetro.

Fuente: Téllez, M. (2008). *Laboratorio de equilibrio y cinética*.

2.10.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA.-

La espectroscopia de absorción atómica es un método para la detección y la determinación de elementos químicos, particularmente de elementos metálicos. Los compuestos, para su examen, se tienen que romper en los átomos que los constituyen. Ello se realiza por pulverización en una llama a alta temperatura.

En la **Fig. N°10**, se muestra la experimentación gráficamente, un rayo luminoso de una longitud de onda, producido por una lámpara, se dirige a lo largo del eje longitudinal de una llama plana y hacia un espectrofotómetro.

Simultáneamente, la solución de la muestra es aspirada hacia el interior de la llama. Antes de entrar en esta, la solución es dispersada formando una niebla de gotitas muy finas, que se evaporan en la llama dando inicialmente la sal seca y luego el vapor de la sal, el cual se disocia, por lo menos en parte, en átomos del elemento que se desea determinar.⁽⁸⁹⁾

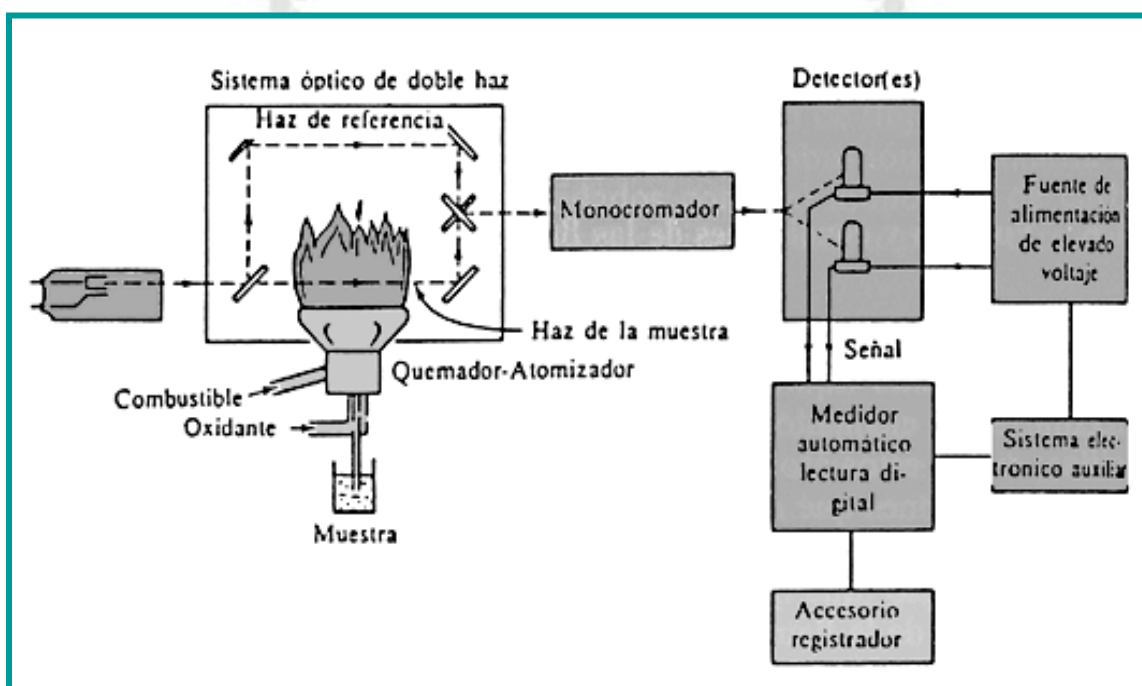


Fig. N° 10. Esquema de un Espectrofotómetro de Absorción Atómica.

Fuente: Téllez, M. (2008). Rouessac. (2000). *Métodos y técnicas instrumentales modernas-Análisis Químicos*. Granada, España: Mc Graw Hill.

En la **Tabla N° 7.**, se detallan las longitudes de onda, con las cuales debe realizarse la experimentación de la absorción atómica y están dadas en unidades Angstrom. Las sensibilidades corresponden a lo siguiente; AA: inferior a 0.01 ppm, A: 0.01 – 0.05 ppm, B: 0.05 – 0.10 ppm.⁽⁸⁹⁾

Tabla N°7. Longitudes de onda y sensibilidades en absorción atómica.

ELEMENTO	LONGITUD DE ONDA	SENSIBILIDAD	ELEMENTO	LONGITUD DE ONDA	SENSIBILIDAD
Cd	2288	A	Mn	2795	A
Co	2407	B	Ni	2320	B
Cr	3579	B	Pb	2170	C
Cu	3248	A	Sn	2246	Baja

Fuente: Rouessac. (2000). *Métodos y técnicas instrumentales modernas-Análisis Químicos*. Granada, España: Mc Graw Hill.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES:

3.1.1.MATERIALES DE VIDRIO

- Baguetas.
- Balón (500 mL).
- Beaker (250, 100 y 50 mL).
- Frascos de vidrio (50 mL).
- Vasos de precipitado (50 mL, 100 mL).
- Matraces (100 mL, 250 mL).
- Pipetas (10, 5 y 2 mL).
- Placas petri (90 x 15 mm).
- Placas petri (50 x 15 mm).
- Tubos de cultivo.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Probeta (100 mL).
- Tubos de ensayo.

3.1.2. REACTIVOS

- Peptona (5g/L).(DIFCO).
- Glucosa (10 g/L).(DIFCO).
- Extracto de levadura (5g/L). (DIFCO).
- Triptona (5g/L).(DIFCO).
- Agar agar (15g/L).(DIFCO).
- Medio LIA.
- Medio TSI.
- Agar Citrato de Simmons.
- Agar Cetrimide.

- Sulfato de Cobre.(MERK).
- Nitrato de Cadmio.(MERK).

3.1.3. INSUMOS

- Agua desionizada.
- Bolsas de cierre hermético.
- Guantes estériles.
- Papel kraft.
- Marcador líquido.

3.1.4. EQUIPOS

- Autoclave.
- Balanza electrónica.(OHAUS SPJ 2011).
- Centrifuga.
- Potenciómetro.
- Termómetro.
- Estufa.
- Microscopio.
- Espectrofotómetro. (UV1700 PHARMA SPEC SHIMADZU).
- Cocinilla.

3.2. MÉTODOS.-

3.2.1. LUGAR DE EJECUCION.-

El presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios del pabellón “H” de la Universidad Católica de Santa María, el Análisis de Espectroscopia Atómica se realizó en el laboratorio de Análisis Químico de la facultad de Química de la Universidad Nacional de San Agustín.

3.3. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.-

Un plan de *Toma de Muestra* debe asegurar que la muestra obtenida refleje adecuadamente las propiedades que interesan al objetivo de la investigación. Para conseguirlo es necesario seleccionar sub áreas y métodos de toma de muestra en base a criterios estadísticos y/o experiencia previa. Como indica el manual de Muestreo y manipulación de muestras del laboratorio de Control de Calidad.

El material de los contenedores debe ser cuidadosamente seleccionado para evitar posible contaminación o pérdida de analitos (el polietileno y el teflón son materiales por lo general bastante aconsejables).⁽¹⁰⁰⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Las muestras se toman de suelos salinos e hiperáridos de la región Arequipa, cuyas coordenadas UTM se registran con un equipo GPS. Se determinan 3 sitios de muestreo donde se hallan piedras traslúcidas de cuarzo que presentan diversas coloraciones y se encuentran en la superficie del terreno. Se extraen las muestras con martillo y cincel, se transportan al laboratorio en bolsas de polietileno, selladas herméticamente y conservadas a temperatura ambiente.

3.4. EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DEL SUELO.

3.4.1. MÉTODO CONDUCTIMÉTRICO.-

Este método se basa en la teoría de la disociación electrolítica. Es aplicable a aguas o extractos de suelo. El equipo para medir la conductividad eléctrica es un conductímetro, que consiste en dos electrodos colocados a una distancia fija y con líquido entre ellos.

Los electrodos son de platino y en ocasiones pueden llevar un recubrimiento de platino negro o grafito; estos se encuentran sellados dentro de un tubo de plástico o vidrio (celda), de tal manera que este aparato puede ser sumergido en el líquido por medir. La resistencia eléctrica a través de los electrodos se registra a una temperatura estándar, generalmente 25°C.⁽³³⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se llevan muestras de aproximadamente 800 g al laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de San Agustín.

El método utilizado es el de la pasta saturada, el cual consiste en pesar 600 g de suelo seco, se coloca en un recipiente de plástico, se agrega agua destilada y se mezcla con la espátula hasta que esté totalmente humedecido.

Se deja reposar la pasta durante 3 h y luego se realiza la filtración al vacío, se mezcla nuevamente la pasta hasta obtener un extracto de aproximadamente 50 mL.

Se calibra el conductímetro, con una solución estándar de KCl, 0.1 N. Antes de usar.

3.4.2.DETERMINACIÓN DE SALES DISUELTAS TOTALES (SDT) SEGÚN LA FÓRMULA DE MARRION BABCOCK.-

La cantidad de sales solubles, expresada como *SALES DISUELTAS TOTALES* se utiliza para medir la salinidad ya que existe una relación directa dada la relación que existe entre el contenido salino de una solución y su capacidad para transmitir la corriente eléctrica. La relación entre la concentración de aniones y cationes (*C*) y la conductividad eléctrica (*CE*) varía según la composición iónica de la solución. Hasta valores de la *CE* de 3 dS/m, el factor de proporcionalidad puede variar entre 8 y 11.

La unidad de medida es el dS/m equivalente al mmho/cm. (104).

PROCEDIMIENTO.-

Se toma en cuenta la relación de Marion y Babcock (1976):

$$\log C' = 0.955 + 1.039 \log CE$$

Donde, *C'* es la concentración de meq/L corregida por la formación de pares iónicos.

Y *CE* es la conductividad en dS/m.

3.4.3.MEDIDA DE% DE CLORUROS.-

a) *MÉTODO DE MOHR.-*

Este método se utiliza para determinar iones cloruro mediante una valoración de precipitación, donde el ión cloruro precipita como AgCl, utilizando como patrón una solución de AgNO₃ de concentración conocida y como indicador el K₂CrO₄ que comunica a la solución en el punto inicial una coloración amarilla y forma en el punto final un precipitado rojo ladrillo de Ag₂CrO₄ observable a simple vista. ⁽¹⁰³⁾

b) *PROCEDIMIENTO.-*

Se prepara una solución de Nitrato de Plata 0.1 N, con 16.994 g de AgNO₃ Q.P, Se estandariza con una solución de NaCl de 0.1N, esta se prepara con 0.585 g de NaCl en 100 mL. Para las valoraciones se utiliza el Factor de Corrección 0.9800.

Se pesa aproximadamente 3 g de muestra de suelo (de cada zona de muestreo), se disuelve en agua destilada, se agrega una solución de K₂CrO₄, se carga y enrasa a cero la bureta con una solución de AgNO₃ 0.1 N, cuándo se observó una coloración rojo ladrillo se suspende la titulación, se anotan los volúmenes. Y se reemplaza en la fórmula:

$$\% \text{ NaCl} = 5.85 \times (\text{gasto}) \times \text{N} / \text{Masa (g)}$$

3.4.4.DETERMINACIÓN DE CONDICIONES METEREOLÓGICAS.-

a) *SOFTWARE “SURFACE METEOROLOGY AND SOLAR ENERGY”.-*

En el software online publicado por la NASA “Surface Meteorology and solar Energy”, se encuentra una gran base de datos de parámetros meteorológicos y de radiación solar obtenidos a través de más de 200 satélites, importantes para

determinar las condiciones medioambientales en las cuales las muestras fueron extraídas de la zona árida.

b) PROCEDIMIENTO.-

La página web se llama: Surface Meteorology and Solar Energy, se ingresa mediante la dirección URL:<http://eosweb.larc.nasa.gov/sse/>. Se introduce los datos de coordenadas latitud/longitud y se obtiene la información de humedad, velocidad del viento y radiación solar, que son importantes para determinar el tipo de ambiente del cual se extraen las muestras.

3.5. SIEMBRA Y CULTIVO DE BACTERIAS.-

3.5.1. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA CULTIVOS MADRES.-

La biomasa microbiana del suelo es la fuerza de conducción de la mayoría de los ecosistemas terrestres ya que esta biomasa controla la tasa de mineralización de los substratos orgánicos.

Los poros del suelo de mayor diámetro son accesibles para todos los microorganismos, mientras que los poros muy pequeños tienden a ser ocupados únicamente por ciertas bacterias. Aunque menos del 0.5 % del espacio poroso se encuentra realmente ocupado por los microorganismos, existen pocos poros en el suelo en los que no existan microorganismos. Incluso los poros muy pequeños serán ocupados por virus del suelo. ⁽¹⁰¹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

En un beaker se toma 50 mL de una solución salina de NaCl al 0.9 %, luego se añade 5 g de piedras de cuarzo trituradas, se agita hasta observar que las piedras hayan desprendido alguna cantidad de la tierra que las rodea y se deja sedimentar las partículas durante 5 min con la finalidad que todos los microorganismos presentes se transfieran a la solución salina.

3.5.2. SIEMBRA Y CULTIVO DE PLACAS MADRE.-

Se trata de un método rápido y simple de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri. El objetivo es

obtener, a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa. Cada una de estas bacterias originará una colonia. ⁽³⁾.

PROCEDIMIENTO.-

De la solución salina con piedras de cuarzo, denominadas según su coloración (Blanca, Marrón y Verde), se toma un asa de Kolhe y se siembra por triplicado en agar PTYG con una concentración de 0.7 % de salinidad, pH 7 y 37°C en placas de 90 x 15 mm. Se evalúa el crecimiento cada 24 h y luego se procede con los aislamientos.

3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.-

3.6.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.-

Cuando las bacterias crecen en la superficie de un medio de cultivo sólido, las células en división permanecen aproximadamente fijas en su posición y forman masas de muchos millones de células visibles a simple vista. Las colonias así formadas varían desde un tamaño diminuto, apenas visible, hasta masas de varios milímetros de diámetro. El tamaño, forma, textura, color y en algunos casos olor son, a veces, muy orientativos para la identificación de las bacterias que la componen. Aunque estas características dependen a menudo de la naturaleza del medio de cultivo y de las condiciones de incubación, cuando éstas se controlan cuidadosamente, son muy constantes y, en muchas ocasiones, tienen un valor diferencial considerable.

La morfología de las colonias es una de las características básicas de las bacterias y es indispensable su estudio para comenzar correctamente una identificación preliminar. Las características morfológicas más importantes de una colonia bacteriana aislada sobre un medio de cultivo sólido son: tamaño, morfología, superficie consistencia, pigmentación olor, etc. ⁽⁵⁸⁾

PROCEDIMIENTO.-

Se observa la formación de colonias de la primera siembra y se selecciona de acuerdo a las características morfológicas macroscópicas como tamaño, forma, elevación, textura y color.

3.6.2. CARACTERIZACION MICROSCOPICA DE LAS CEPAS.-

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena. Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos. Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas. Los bacilos curvos pueden tener forma de coma. ⁽⁷⁷⁾.

- OBSERVACIÓN DIFERENCIAL DE MUESTRAS:

La tinción diferencial es la técnica más utilizada en Bacteriología pues permite la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes que se comportan de diferente forma según el microorganismo en cuestión. Las tinciones especiales se usan para objetivar distintas estructuras como la cápsula, el núcleo, los flagelos, los esporos, etc.

La coloración Gram es la más usada en bacteriología; es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram + positivas o Gram - negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo.

La diferente reacción de las bacterias a la coloración Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células. ⁽⁷⁷⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se realiza una coloración Gram, para ello se toma un portaobjetos limpio y seco y se coloca una gota de cultivo bacteriano, se hace un frotis y se flamea unos segundos, se rosea cristal violeta sobre la superficie y se deja 1 min, se lava el portaobjetos con agua, se cubre con lugol durante 1 min, se lava nuevamente con agua, se decolora con alcohol-acetona durante 10 s, se cubre con safranina durante 1 min, se lava la placa y se deja secar, se observa al microscopio a un aumento de 10X, 40X y 100X.

3.7. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO.-

El conocimiento de los factores ambientales nos permite explicar la distribución de los organismos en la naturaleza; por otro lado, el conocimiento de los factores limitantes del crecimiento microbiano se puede utilizar para su control, sobre todo en el caso de organismos que son importantes para el estudio de alguna característica de interés. ⁽⁴⁴⁾.

3.7.1. FACTOR: SALINIDAD.-***PROCEDIMIENTO.-***

Se prepara placas conteniendo medio PTYG y se modifica la salinidad en los siguientes porcentajes: 3 %, 9 %, 12 % y 15 %. Se deja incubar durante 48 h a pH 7 y 37 °C, se observa los resultados y con el porcentaje de salinidad óptimo hallado para cada cepa se procede a hallar el siguiente parámetro.

3.7.2. FACTOR: pH.-***PROCEDIMIENTO.-***

Se prepara placas conteniendo medio PTYG, se modifica el pH, pero en este caso se utiliza el porcentaje de salinidad óptimo para cada cepa, los valores de pH con los que se trabaja fueron 4, 7 y 9, para obtenerlos se regula con $NaOH$ y H_2SO_4 . Se deja incubar durante 48 h y 37 °C, se observa los resultados y con el valor de pH óptimo para cada cepa se procede a hallar el siguiente parámetro.

3.7.3. FACTOR: TEMPERATURA.-

PROCEDIMIENTO.-

Se preparara placas conteniendo medio PTYG y se modifica las condiciones de temperatura, pero en este caso se utiliza el porcentaje de salinidad óptimo y el valor de pH óptimo para cada cepa, los valores de temperatura con los que se trabajaran son 4°C, 25°C, 37°C y 55°C, se deja incubar durante 48 h.

3.8. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS:

Las pruebas o ensayos bioquímicos, son pruebas simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara una determinada característica bioquímica como presencia o ausencia de una determinada actividad enzimática, grupo de enzimas o determinada vía metabólica, crecimiento a una determinada temperatura, crecimiento en presencia de inhibidores, etc. Para llevarlas a cabo, se pueden utilizar diferentes sistemas de trabajo (medio de cultivo, indicador, revelador, etc.) que puede ser diferente aún para el mismo ensayo si se trata de diferentes microorganismos.

A la determinación de la especie se puede llegar según diversos sistemas (manuales de identificación comerciales, etc.).⁽⁷⁸⁾

a) PRUEBA: CULTIVO EN AGAR SANGRE.-

La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes.

El NaCl mantiene el balance osmótico. El agregado de sangre al medio de cultivo, en concentración final de 5-10 %, aporta nutrientes para el crecimiento bacteriano y permite detectar hemólisis.⁽¹¹⁾

PROCEDIMIENTO.-

Se pesa 6 g de agar base sangre, se mezcla con 100 mL de agua destilada, se homogeniza, se esteriliza, se añade 9 mL de sangre, se homogeniza y se plaquea.

Se siembra la muestra en la superficie del medio de cultivo por estría cruzada y se incuba 18 – 48 h a 37°C.

b) PRUEBA: CATALASA.-

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aerobias. Descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva. ⁽⁹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

En un portaobjetos se deposita una colonia de los microorganismos a estudiar con ayuda del asa de siembra, se agrega directamente una o dos gotas de peróxido de hidrógeno sobre las colonias.

c) PRUEBA: OF.-

El metabolismo de un glúcido puede seguir la vía oxidativa o fermentativa. En la vía oxidativa el aceptor final de electrones debe ser el oxígeno y por consiguiente el proceso es aerobio y produce poca acidez, mientras que en vía fermentativa el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico y el proceso es anaerobio, originando mucha acidez en poco tiempo.

La fermentación u oxidación del glúcido se puede ver en dos tubos con medio de cultivo glucosado, uno abierto (aerobio) y otro cerrado con parafina (anaerobio). Utilizamos para esta prueba el medio semisólido de Hugh-Leifson al que se le añadió glucosa para observar si el metabolismo de este azúcar es llevado a cabo por vía oxidativa o fermentativa. Si la vía es la oxidativa, solamente el tubo abierto virará ligeramente en la parte superior a color amarillo. Si la vía es la fermentativa hay un viraje intenso a amarillo que comienza en el fondo de los dos tubos. ⁽⁹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se prepara dos tubos de medio de cultivo Hugh-Leifson. Se inocula con ayuda de una pipeta Pasteur llegando al fondo y ascendiendo hacia la superficie. Se deja solidificar ambos tubos y se recubre uno de ellos con vaselina estéril. Se incuba a 37°C durante 48 h.

d) PRUEBA: OXIDASA.-

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo-oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Se investiga la presencia del enzima citocromo-oxidasa en la bacteria en estudio. La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.

Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso. ⁽⁹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se coloca un trozo de papel de filtro de 3 x 3cm aproximadamente en una placa de Petri y se agrega 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel. Se extiende con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.

e) PRUEBA: LIA.-

Es un medio que sirve para demostrar la producción de dos enzimas: la lisina descarboxilasa y la lisina desaminasa, además la presencia de sales de hierro sirve para detectar la producción de H₂S por algunos microorganismos.

La descarboxilación de la lisina ocurre en ambiente anaeróbico o sea en el fondo del tubo y se pone de manifiesto por la alcalinización del medio produciendo un viraje del indicador púrpura de bromocresol. La presencia de glucosa en los componentes del *LIA* determina primero una reacción de fermentación, produciendo acidificación y cambio de color del medio a amarillo y el pH favorable para la reacción de descarboxilación que ocurre después, volviendo a su color violeta original la parte del fondo del tubo.

La desaminación de la lisina que se puede producir por los géneros *Proteus* y *Providencia* tiene lugar en la parte superior del tubo produciendo ácido acetocarbónico que al combinarse con la sal de hierro y en presencia de oxígeno forma un color violeta rojizo. La producción de H_2S se evidencia por la presencia de un precipitado negro por utilización de las sales de hierro. Reacción positiva es un precipitado negro, y fondo y superficie del medio púrpura. Reacción negativa: fondo amarillo, superficie púrpura. ⁽⁹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se inocula realizando siembra mixta con doble picadura a partir de una colonia del cultivo del microorganismo en estudio, durante 24 h a 37 °C.

f) PRUEBA: TSI.-

Es una prueba usada para la fermentación de la glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de H_2S por parte de la bacteria sumándole producción de gas. El cambio de color rojo-anaranjado (color inicial del medio) a amarillo indica fermentación. Si se fermenta únicamente la glucosa el cambio de color del medio ocurre solamente en el fondo debido a que se encuentra 10 veces menos concentrada que la sacarosa y la lactosa, además los radicales libres no son suficientes para hacer virar el medio.

Si se fermentan los 3 azúcares hay cambio de color tanto en la superficie como en el fondo. La presencia de burbujas que rompen el medio y a veces tienden a expulsarlo indica presencia de gas como producto final de la fermentación.

A: Reacción acida. Color amarillo

A/A: Fermentación 3 azúcares

K: Reacción alcalina. Color roja naranja

K/A: Fermentación de la glucosa

Burbujas: Producción de gas

K/K: No hay fermentación de los 3

Precipitado negro: Formación H_2S . (Britanialab, 2010).

PROCEDIMIENTO.-

Se inocula el medio realizando siembra mixta del microorganismo en estudio, durante 24 h a 37 °C.

g) PRUEBA: CETRIMIDE.-

La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de *P. aeruginosa* y estimular la formación de pigmentos. Es éste un medio muy semejante al King A, en el cual el cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina y piomelanina de *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*. Una reacción positiva se observó por el crecimiento en el medio. Una reacción negativa se indicó por la ausencia, o pobre crecimiento sin cambio de color en el medio que permanece. ⁽¹¹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se siembra la muestra de ensayo en la superficie del medio de cultivo por estría cruzada y se incuba 18 – 48 h a 37°C.

h) PRUEBA: CITRATO DE SIMONS.-

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático. El NaCl mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH, que vira al color azul en medio alcalino. El

medio de cultivo es diferencial en base a que los microorganismos capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, usan sales de amonio como única fuente de nitrógeno, con la consiguiente producción de alcalinidad.

Una reacción positiva se observa por el crecimiento en el medio con un intenso color azul. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente, oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino, da origen a ácidos orgánicos que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio entonces vira al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa. Una reacción negativa se indica por la ausencia, o pobre crecimiento sin cambio de color en el medio que permanece verde. ⁽¹¹⁾.

PROCEDIMIENTO.-

Se obtiene un cultivo puro del microorganismo a ser probado, se toma una colonia a partir de un medio sólido y se siembra por estría sólo la superficie del medio. Se incuba los medios durante 18 - 48 ha 37°C.

3.9. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.-

En la **Fig. N°11**. Se observa que la curva de crecimiento bacteriano se divide en cuatro fases denominadas fase de latencia, fase exponencial o fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. ⁽⁹⁾.

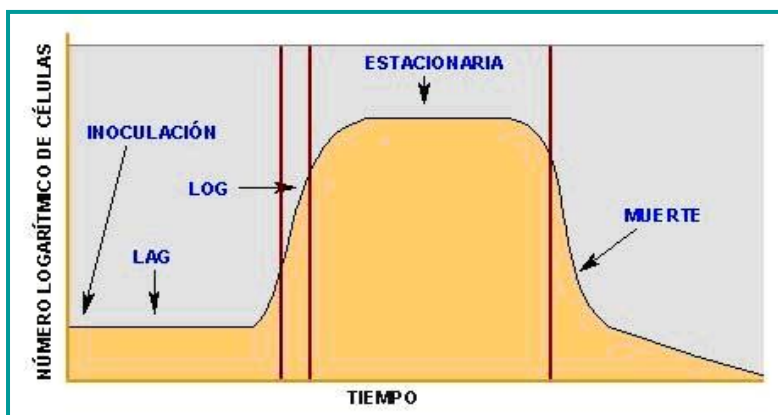


Fig. N° 11. Representación de una Curva de Crecimiento Bacteriana y sus fases.

Fuente: Brock. (2004). Crecimiento Bacteriano. En M. P. Madigan, *Biología de los microorganismos (10 ed.)*. Prentice Hall.: Prentice Hall.

En un gráfico de los resultados del número de células tanto en escala aritmética se obtiene una curva con una pendiente que crece constantemente. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial y es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica. ⁽⁹⁾.

a) **PROCEDIMIENTO.-**

Se prepara 250 mL, de caldo de cultivo PTYG y se separaran en 2 matraces respectivamente, se tomó una placa con bacterias en crecimiento exponencial y se inoculó en el primer matraz.

Se deja crecer durante la noche, a la primera hora se inocula el segundo matraz y realiza lecturas paralelas en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Se anota los datos y se realiza el gráfico en *MS Excel*.

3.10. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cu (II) y Cd (II). -

3.10.1. MÉTODO DE INMOVILIZACION EN ALGINATO DE CALCIO.-

Consiste en la inmovilización de células dentro de una matriz, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes. (51).

El procedimiento general para el atrapamiento de las moléculas en gotas de polímeros, consiste en suspender el microorganismo a inmovilizar en una solución líquida que contiene los monómeros de la macromolécula.

Para la gelificación de esta mezcla se usan diferentes métodos de acuerdo a la naturaleza del polímero a usar. Entre los métodos a usar se encuentran la disminución o aumento de temperatura, la gelificación ionotrópica de macromoléculas con cationes multivalentes, y otros métodos químicos como la adición de las gotas a un buffer enfriado en hielo o en diferentes soluciones químicas. (22).

PROCEDIMIENTO.-

Se centrifuga 10mL del inóculo de cada cepa en fase exponencial a 3000 RPM por 2 min; se elimina el sobrenadante y se resuspende el sedimento. Se repite el procedimiento hasta obtener 0.5 g de cultivo bacteriano/sistema.

Se prepara una solución de 50 mL al 2.5 % de alginato de sodio, posteriormente se agrega el sedimento que se obtiene en el paso anterior y se agita vigorosamente. Se prepara 100 ml de una solución de CaCl_2 0.2 M y se deposita en un beaker a temperatura ambiente.

Se deja caer por goteo continuo (utilizando una pipeta de 5mL) desde una altura de 10 cm, la solución de alginato inoculada, para formar perlas de alginato de calcio de entre 1 a 2 mm de diámetro y se deja 10 min en la solución de CaCl_2 para su completa formación.

a) MEDIDA DE LA REMOCION DE METALES PESADOS DE Cu (II) y Cd (II).-

PROCEDIMIENTO.-

Se deposita las perlas obtenidas del procedimiento anterior en 150 mL de medio PTYG contaminado con 10 ppm y 100 ppm de Sulfato de Cobre, asimismo para las pruebas con Nitrato de Cadmio a 10 ppm y 100 ppm respectivamente.

Se deja incubar en agitación en un shaker orbital durante quince días a 37 °C y pH 7, evaluando cada tres días la turbidez y tomando muestras de 30 mL. Se lleva a analizar por Espectrofotometría de Absorción Atómica en el laboratorio de Análisis Químico de la Universidad Nacional de San Agustín.

b) ANALISIS ESTADISTICO

Se obtienen gráficas que explican la remoción por parte del consorcio inmovilizado utilizando el software *Statgraphics plus 5.1* y *MS Excel*.

- Test de T-Student.-

El propósito fundamental de los análisis estadísticos de tipo inferencial es el conocimiento de poblaciones a partir del estudio de muestras o subconjuntos representativos y suficientes de dichas poblaciones.⁽³³⁾

En este tipo de análisis de probabilidad, el muestreo y la estimación de parámetros (de tipo puntual e intervalos) destacan el importante papel que juegan los contrastes de hipótesis. Los términos “contraste de hipótesis” son sinónimos de “pruebas de significación” y se refieren a los procedimientos estadísticos mediante los cuales aceptamos o rechazamos una hipótesis nula (H_0) lo que automáticamente nos habilita para rechazar o aceptar otra hipótesis denominada hipótesis alternativa (H_1). Mientras la primera postula la ausencia de diferencias estadísticamente entre dos medidas o más (las que existen se deben al azar), la segunda postula todo lo

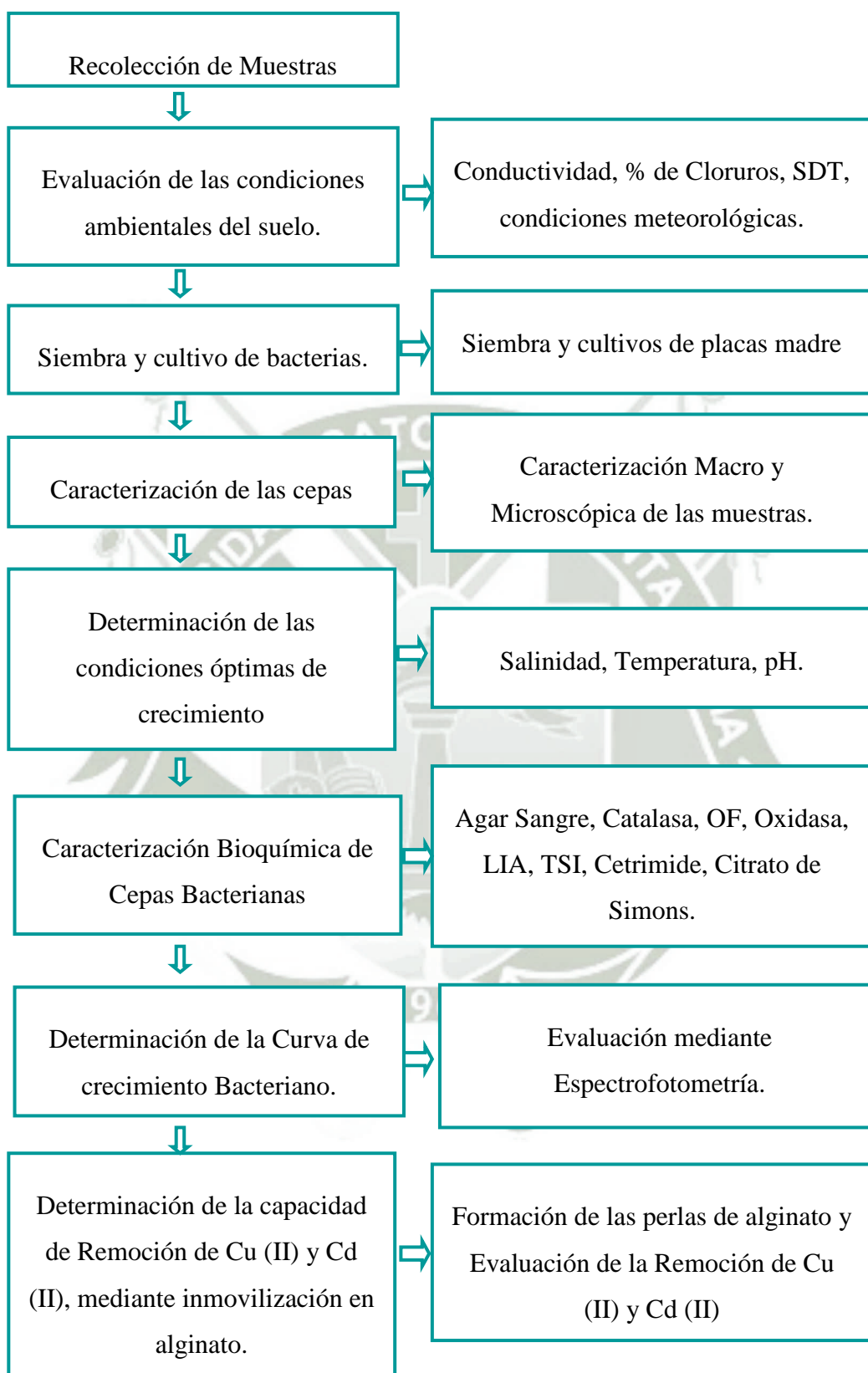
contrario, o sea, la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre dos o más medidas. ⁽³⁰⁾.

- ANOVA

FUNDAMENTO.-

Es una prueba semejante a la prueba “t” en cuanto a la práctica, pero la comparación entre grupos no se basa en las diferencias entre las medias, sino en la varianza de la variable numérica “Y” o variable dependiente en cada grupo (nivel) de la variable categórica “X” o variable independiente. Si las diferencias entre las varianzas de cada grupo son mayores que las intragrupalas (fuente de variación intra), seguramente se reportaran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que no son debidas al azar. Así, mientras en las pruebas de significación para dos grupos obtenemos valores empíricos “t” y “z” en el ANOVA, la cifra estadística obtenida se denomina razón F de Snedecor. Al ser F el resultado de dividir la media cuadrática inter entre la media cuadrática intra cuanto mayor sea el dividendo mayor, por tanto, será el cociente y mayor, por ende, la probabilidad de que existan diferencias estadísticamente significativas. ⁽³⁰⁾.

FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. RECOLECCION DE MUESTRAS:

Para la recolección de las muestras se utilizó un método descrito en el Manual de Control de Calidad UD4, (2009), donde señala la importancia del manejo de los instrumentos para no dañar y evitar la pérdida de muestra de interés.

Para ello se identificó la zona de muestreo ubicado en una quebrada del distrito de Uchumayo - Arequipa, la hora del muestro fue alrededor del primer tercio del día, donde incidencia solar es alta, siendo la hora máxima de radiación alrededor de las 11:00 a.m.- 2:00 p.m., los vientos son violentos y altos, siendo el movimiento de arena característico de la quebrada.

Según la **Fig. N° 12**, el **punto A.-** Corresponde al nivel de muestreo bajo, en cuya área las piedras de cuarzo se encontraron dispersas. La zona es un lugar deshabitado, se observó el movimiento de cuarzos atribuyendo a los vientos y el movimiento de arena (*desenterramiento*);



Fig. N°12. Vista general del sitio de muestreo de la Mina no Metálica en el distrito de Uchumayo-Región Arequipa.

Como se observa en la **Fig. N° 12**, el **punto B**, corresponde al nivel de muestro medio, en este punto se realizó un ascenso corto para ubicar las piedras de cuarzo, las cuales se encontraron enterradas en arena, debido a que la disposición geográfica de la quebrada no permite el movimiento de arena, aumentando el nivel de acumulación, difiriendo con las zona A, y C. En el **punto C**, corresponde al nivel de muestreo más alto, aquí el ascenso fue máximo aproximadamente unos 25 metros lineales, las piedras estaban acumuladas y expuestas.

En la **Fig. N° 13**, se muestra la disposición de las piedras, estas se encuentran acumuladas unas con otras y para obtener la muestra se tomó en cuenta el color de las mismas y el tamaño.



Fig. N° 13. Piedras y Cuarzos encontrados para el muestreo.

Se tomó aproximadamente 500 g de la arena de alrededor de las piedras para realizar estudios de salinidad y evaluar parámetros fisicoquímicos ambientales, se tomó en cuenta según lo descrito por Fernández Linares (2006), el cual señala que muestrear alrededor de la zona de interés es necesario para el seguimiento y caracterización de un tipo de suelo.

Se observó la diferencia de tamaños y colores, indica Wierzchos (2004), que sólo a unos pocos milímetros por debajo de la superficie de la tierra se encuentran distribuidas algunas colonias bacterianas, teniendo mayor afinidad por rocas halitas translúcidas también indica que en cantidades de traza se encuentran estos microorganismos, dicha afirmación consideramos valedera para realizar el aislamiento de microorganismos, debido a que las características que señala son estrechamente relacionadas con las del estudio.

En la **Fig. N° 14**, se observan las piedras muestreadas que tendrían que oscilar entre café y blanco. Se encontró una piedra en su cuyo interior tuvo un color verde turquesa y se tomó muestra de ella.

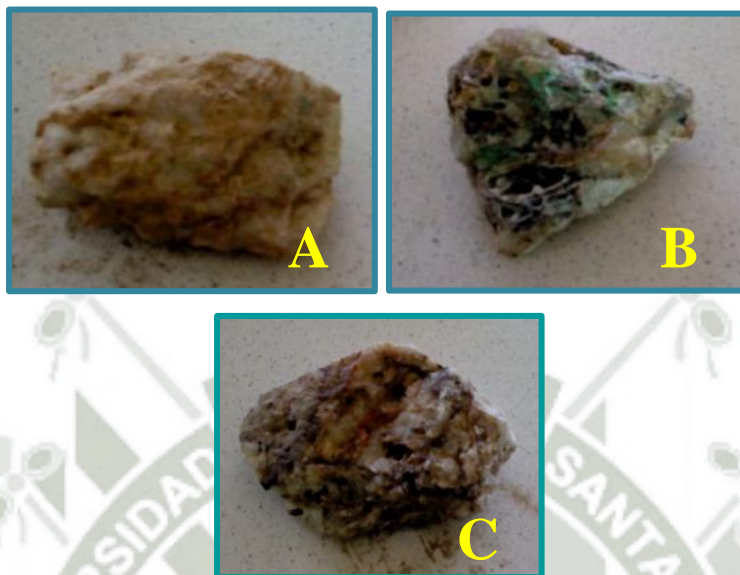


Fig. N°14. Piedras de cuarzo para obtención de bacterias, A.- piedra blanca con coloración café; B.- piedra blanca con coloración verde-turquesa y C.- piedra café con coloración café.

En la **Fig. N° 15**, se observa la vista de *Google Maps* para ubicar geográficamente la disposición del lugar de muestreo, las coordenadas de latitud y longitud, se ubicaron con un equipo GPS.



Fig. N° 15. Vista de Google Maps de la zona Muestreada ($16^{\circ} 21' 17.48''$ S, $71^{\circ} 36' 09.03''$ O).

4.2. EVALUACION DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES DEL SUELO.-

4.2.1.DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD.-

La conductividad se realizó en el laboratorio de Análisis Químicos de la Universidad Nacional de San Agustín, en la **Tabla N°8** se presentan los resultados, se indica por zona de muestreo.

Tabla N°8. Resultados de la Conductividad

UNIDADES	ZONA ALTA	ZONA MEDIA	ZONA BAJA
$\mu\text{S/cm}$	5545	4155	4310
mohm/cm	5.545	4.155	4.31

Se determinó la conductividad eléctrica para clasificar el tipo de suelo del cual se tomó las muestras, este parámetro es por lo tanto una forma indirecta de medir la salinidad de extractos de suelo y clasificarlos como indica Vásquez y Bautista (1993), en la **Tabla N° 9**:

Tabla N°9. Categoría de Salinidad de Suelos.

Categoría del suelo	Valor (mmhos/cm o dS/m)
No salino	0 - 2.0
Poco salino	2.1 - 4.0
Moderadamente salino	4.1 - 8.0
Muy salino	8.1 - 16.0
Extremadamente salino	> 16.0

Fuente: Vásquez. (2006). *Control de la salinización de suelos y aguas y recuperación de suelos salinos*. San Fernando de Henares, Madrid.

De la **Tabla N°9**, se concluye que el suelo es considerado como moderadamente salino debido a que los valores de conductividad oscilan entre 4.1 mohm/cm y 5.5mohm/cm.

4.2.2.DETERMINACIÓN DE SALES DISUELTAS TOTALES (SDT) SEGÚN LA FÓRMULA DE MARION BABCOCK (1976).-

Se aplica la fórmula de *Marion Babcock (1976)* sobre la relación de Sales Disueltas Totales (SDT) y la conductividad, los resultados se obtuvieron en meq/L.

$$\log C = 0.955 + 1.039 \log CE$$

En la *Tabla N° 10*, se detallan los resultados de los SDT

Tabla N°10. Tabla de datos de Concentración de SDT

DATOS	UNIDADES	ZONA ALTA	ZONA MEDIA	ZONA BAJA
Conductividad	dS/m	5.545	4.155	4.31
Concentración de SDT	(meq/L)	53.446	39.641	41.138

Aplicando la fórmula para cada caso:

Zona Alta: CE: 5.545 dS/m

$$\log C = 0.955 + 1.039 \log CE$$

$$\log C = 0.955 + 1.039(0.74390)$$

$$\log C = 1.728$$

$$\text{antilog } C = 1.728$$

$$C = 53.456 \text{ meq/L}$$

Zona Media: CE: 4.155dS/m

$$\log C = 0.955 + 1.039 \log CE$$

$$\log C = 0.955 + 1.039(0.619)$$

$$\log C = 1.598$$

$$\text{antilog } C = 1.598$$

$$C = 39.628 \text{ meq/L}$$

Zona Baja; CE: 4.310dS/m

$$\log C = 0.955 + 1.039 \log CE$$

$$\log C = 0.955 + 1.039(0.6345)$$

$$\log C = 1.6142$$

$$\text{antilog } C = 1.6142$$

$$C = 41.136 \text{ meq/L}$$

La cantidad total de sales solubles, expresada como sales disueltas totales (SDT), se utiliza para medir la salinidad de un agua o de un extracto de la solución del suelo, ya que existe una relación directa entre este parámetro y el potencial osmótico de la solución del suelo. Sin embargo por la rapidez de la determinación se utiliza habitualmente la conductividad eléctrica. (CE).

4.2.3. MEDIDA DE % DE CLORUROS-

Para determinar el % de cloruros en los suelos, se tomó en cuenta el viraje del color y el gasto utilizado de la solución de nitrato de plata, el beaker “A” correspondió a la piedra Blanca, el beaker “B” correspondió a la piedra verde y el beaker “C” correspondió a la piedra café.

Los resultados del cambio de color final a rojo ladrillo se muestran en la **Fig. N°16**.

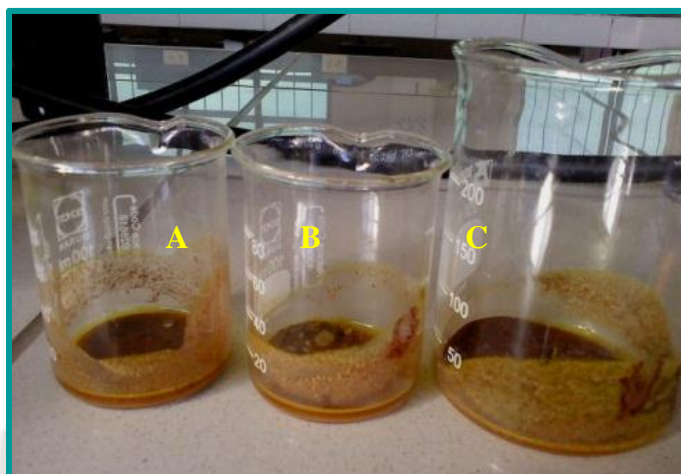


Fig. N°16. Resultados de % Cloruros según el Método de Volhard.

Los resultados del gasto en la titulación indican el porcentaje de cloruros de las muestras, como se muestra en la **Tabla N°11** y este criterio fue considerado para clasificar a las bacterias dependiendo de la concentración de cloruros y se determinó como *Halófilas Moderadas*, según la clasificación de Kusher y Kamekura (1988) en la **Tabla N°2**.

Tabla N°11. Resultado de % de Cloruros

MUESTRA	GASTO ML.	% DE CLORUROS
Piedra blanca "A"	0.6 ml	13.65%
Piedra café "B"	0,4 ml	7.89 %
Piedra verde "C"	0.6 ml	13.65%

4.2.4.DETERMINACION DE LAS CONDICIONES METEREOLÓGICAS, MEDIANTE SOFTWARE "SURFACEMETEOROLOGY AND SOLAR ENERGY".-

Mediante la latitud, se pueden obtener resultados fiables de las condiciones ambientales de un punto exacto de la región, con el software "Surface Meteorology and Solar Energy". En la **Fig .N°17**, se puede observar la entrada principal del software.

La figura A, muestra la primera parte que se observa al ingresar a la página, la figura B, nos indica el primer paso al ingresar los datos que es la locación del lugar a detallar.

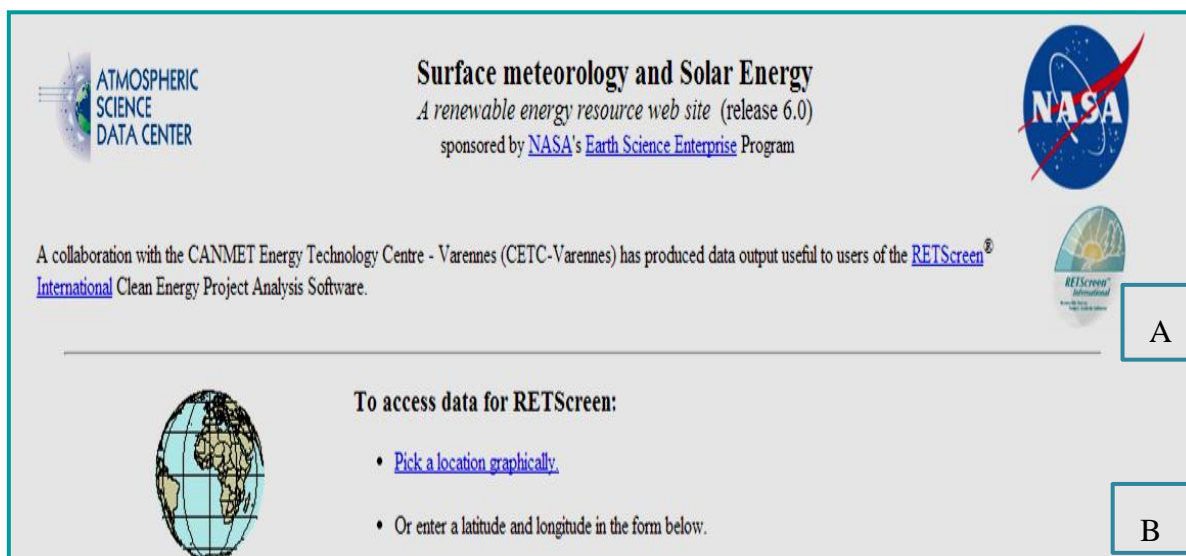


Fig. N° 17. Vista del software utilizado para determinar las condiciones ambientales.

En la **Fig. N° 18**, se muestran los datos obtenidos con el software; para la latitud -16.21, longitud -71.36, en el mes de agosto del 2012, período en el cual se extrajeron las muestras y cuyo valor de humedad fue 40.1%, radiación solar fue 5.19 kWh/m²/d y temperatura 16°C.

NASA Surface meteorology and Solar Energy: RETScreen Data								
Latitude -16.21 / Longitude -71.36 was chosen.								
	Unit	Climate data location						
Latitude	°N	-16.21						
Longitude	°E	-71.36						
Elevation	m	2610						
Heating design temperature	°C	5.26						
Cooling design temperature	°C	19.04						
Earth temperature amplitude	°C	16.7						
Frost days at site	day	0						
Month	Air temperature	Relative humidity	Daily solar radiation - horizontal	Atmospheric pressure	Wind speed	Earth temperature	Heating degree-days	Cooling degree-days
	°C	%	kWh/m ² /d	kPa	m/s	°C	°C-d	°C-d
February	13.5	79.2%	6.32	75.0	3.2	17.1	123	102
August	12.1	40.1%	5.19	75.1	3.5	16.0	172	74

Fig. N° 18. Datos de radiación solar, humedad, presión atmosférica, velocidad del viento, de la zona muestreada.

4.3. SIEMBRA Y CULTIVO DE BACTERIAS:

4.3.1. TRATAMIENTO DE LAS PIEDRAS PARA CULTIVOS MADRES.-

Las piedras trituradas depositadas en beakers con suero salino se observan en la **Fig. N° 19**.



Fig. N°19. Tratamiento de las piedras extraídas de minas no metálicas de Uchumayo para obtención de cultivos madres.

En la solución salina se observó el desprendimiento de material particulado y arena, los cuales provocaron un ligero enturbiamiento del medio, esta característica se presentó en todos los beakers.

4.3.2. SIEMBRA Y CULTIVO DE PLACAS MADRE.

Luego de la siembra en placa madre se clasificó las cepas de acuerdo a su origen, según se muestra en la **Tabla N°12**.

Tabla N°12. Denominación de cepas aisladas

ORIGEN	DENOMINACIÓN	SIGNIFICADO
Piedra Blanca	<i>CMB</i>	Cepa Madre Blanca
Piedra Verde	<i>CMV</i>	Cepa Madre Verde
Piedra Café	<i>CMC</i>	Cepa Madre Café

Los indicadores de crecimiento fueron colocados a criterio, por lo que se tiene que:

- **ALTO**: corresponde al crecimiento por toda el área de estría
- **MEDIO**: corresponde al crecimiento disperso en el recorrido de la estría.
- **BAJO**: corresponde al crecimiento nulo en el recorrido de la estría.

Posteriormente se monitoreo cada 12 horas y se obtuvo diferencias en el crecimiento, como se muestra en la **Tabla N°13**.

Tabla N°13. Reporte de crecimiento de placas madre.

MUESTRA CULTIVADA	CRECIMIENTO/ HORAS				
	24	36	48	60	72
CMB	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Alto
CMV	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto
CMC	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto

En la **Fig. N° 20**, del cultivo madre de la muestra CMB procedente de la piedra blanca, se observa un crecimiento lento cuyas primeras colonias aparecieron al tercer día, encontrándose una variedad de cepas de diversos pigmentos entre los cuales destacan los amarillos, blancos y naranjas.



Fig. N°20. Cultivo madre de la muestra CMB.

En la **Fig. N° 21**, del cultivo madre de la muestra CMV, procedente de la piedra de cuarzo verde, se observa que el crecimiento fue lento, pero a partir del tercer día se fue incrementando, las cepas de esta muestra oscilan en pigmentaciones de color blancas y amarillas.

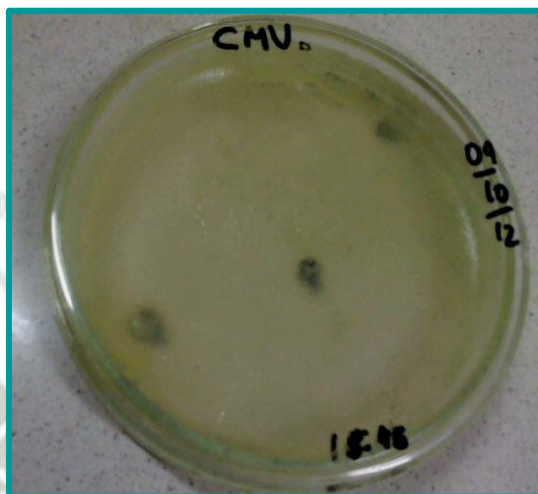


Fig. N°21. Cultivo madre de la muestra CMV.

En la **Fig. N°22**, del cultivo madre de la muestra de CMC, procedente de la piedra café, se observa un crecimiento diluido y lento similar a las otras placas cultivadas.



Fig. N°22. Cultivo madre de la muestra de CMC.

Según indica el informe de Microbiología Ambiental de UDEA, (2007), algunos microorganismos tienen un crecimiento lento, porque algunas células crecen y otras mueren estableciendo un balance total en el incremento del número de células.

Además Sanchez, (2004), en su estudio indica que generalmente la bacterias halófilas moderadas presentan un crecimiento lento, lo cual fue corroborado en la experimentación.

Brok (2008), considera la *adaptación* como el período en el que los microorganismos adecúan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (abundancia de nutrientes y condiciones de cultivo) para iniciar la fase de crecimiento exponencial.

Con estos datos obtenidos y el detalle del crecimiento, se infirió que las bacterias de acuerdo a los nutrientes presentes en el medio de cultivo PTYG, desarrollan mecanismos de adaptación y son capaces de competir exitosamente por el agua y resistir los efectos desnaturalizantes de las sales, cuentan con estrategias que les permiten enfrentar el estrés osmótico: mantienen altas concentraciones intracelulares de sal y sintetizan solutos compatibles que les permiten balancear su presión osmótica. Dichos datos son respaldados por la investigación de Gonzales-Hernández, (2002).

Cada cepa fue calificada según el nombre de la muestra a la cual pertenecen y si había más de una cepa por placa se le colocaba las letras del alfabeto.

De la placa madre procedente de la piedra blanca se obtuvieron seis colonias de diferentes características, las cuales fueron nombradas según el siguiente código para “C” de Cepa, “M” de madre y “B” por la procedencia de la piedra “Blanca”, se procedió luego a nombrar sucesivamente de la A hasta la E, además se obtuvo una cepa adicional N, debido a su color naranja. Las cepas son: *A-CMB*, *B-CMB*, *C-CMB*, *D-CMB*, *E-CMB* y *CMB-N*.

De la placa madre procedente de la piedra verde se obtuvieron tres colonias de diferentes características, las cuales fueron nombradas según el siguiente código para “C” de Cepa, “M” de madre y “V” por la procedencia de la piedra “Verde” y fueron las siguientes: *A-CMV*, *B-CMV* y *C-CMV*.

De la placa madre procedente de la piedra café se obtuvieron cinco colonias de diferentes características según el siguiente código para “C” de Cepa, “M” de madre y “C” por la procedencia de la piedra “Café”, las cuales fueron: *A-CMC*, *B-CMC*, *C-CMC*, *D-CMC* y *CMC-E*.

Para monitorear la esterilidad de los procedimientos de desarrollo de las cepas, se sembró una *PLACA CONTROL* (*Fig. N°23*), en las mismas condiciones no desarrolló crecimiento alguno, entonces se comprueba que hasta esta etapa de desarrollo; la metodología, instrumentos y ambientes no tienen algún factor de contaminación ambiental o procedimental que alteren los resultados.



Fig. N°23. Placa control, se sembró esta placa para poder corroborar la asepsia del aislamiento.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CEPAS.-

4.4.1. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA DE LAS CEPAS AISLADAS.-

Se realizó la identificación macroscópica de las cepas aisladas de los cultivos madres. Se consideró que de este primer repique de selección sean eliminadas las cepas que presentaban morfología (color, textura) semejante entre las muestras de diferente procedencia (piedra blanca, verde, marrón). El medio de cultivo PTYG estuvo preparado a pH neutro, salinidad 0.7%, temperatura de incubación fue de 37 °C durante 48 horas de monitoreo, hasta la aparición diferenciada de las cepas.

En la **Tabla N°14**, se muestra las características de las cepas seleccionadas para el estudio. Se ha reducido así de un número de 14 cepas aisladas a 03 las cuales presentaron características diferentes y atractivas al trabajo.

Tabla N°14. Caracterización Macroscópica de las Cepas aisladas

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CÓDIGO	TAMAÑO	FORMA	OLOR	SUPERFICIE	CONSISTENCIA	PIGMENTACIÓN
Piedra blanca	CMB-N	Grande	Redonda	Inodora	Plana	Rugosa	Naranja
Piedra verde	CMV-B	Grande	Redonda	Inodora	Elevada	Cremosa	Amarilla
Piedra café	CMC-E	Pequeña	Redonda	Inodora	Plana	Cremosa	Blanca

De acuerdo a la **Tabla N°15**, para la cepa CMB se tuvo que la mayoría de las cepas tenían características comunes, color: blancas y amarillas, textura: cremosas, grandes y redondas, estos criterios comunes fueron los que se tomaron en cuenta para poder descartarlas.

Tabla N°15. Caracterización Macroscópica de cepa CMB.

TIPO DE MUESTRA	CODIGO DE CEPA	Tamaño	Forma	Elevación	Textura	Color
PIEDRA BLANCA	A-CMB	Grande	Redonda	Plana	Seca	Naranja
	B-CMB	Grande	Redonda	Plana	Seca	Blanca
	C-CMB	Pequeña	Redonda	Plana	Cremosa	Blanca
	D-CMB	Pequeña	Redonda	Elevada	Cremosa	Blanca
	E-CMB	Pequeña	Redonda	Plana	Cremosa	Amarilla
	CMB-N	Grande	Larga	Plana	Rugosa	Naranja

Solo se seleccionó las colonias de color naranja (CMB-N), debido a que no se encontraron en ninguna otra placa.

De acuerdo a la **Tabla N°16**, para la placa CMV se obtuvo tres cepas de las cuales dos son de características similares en cuanto a color y textura.

Tabla N°16. Caracterización Macroscópica de cepa CMV.

TIPO DE MUESTRA	CODIGO DE CEPA	Tamaño	Forma	Elevación	Textura	Color
PIEDRA VERDE	A-CMV	Pequeña	Redonda	Puntual	Seca	Blanca
	B-CMV	Pequeña	Redonda	Elevada	Cremosa	Amarilla
	C-CMV	Grande	Redonda	Plana	Seca	Blanca

Solo se seleccionó las colonias de color amarilla (C-CMV) puesto que esta tenía una formación definida en comparación con las otras.

De acuerdo a la **Tabla N°17**, para la placa CMC, se tiene diversidad de cepas, lo que se comparó con las placas anteriores y se seleccionó la correspondiente a la colonia blanca cremosa (E-CMC).

Tabla N°17. Caracterización Macroscópica de cepa CMC.

TIPO DE MUESTRA	CODIGO DE CEPA	Tamaño	Forma	Elevación	Textura	Color
PIEDRA CAFÉ	A-CMC	Pequeña	Redonda	Plana	Cremosa	Amarilla
	B-CMC	Pequeña	Irregular	Plana	Seca	Blanca
	C-CMC	Grande	Irregular	Elevada	Seca	Blanca
	D-CMC	Media	Redonda	Plana	Cremosa	Naranja
	CMC-E	Pequeña	Redonda	Plana	Cremosa	Blanca

Según Flores-Fernandez (2010), el cual aísla bacterias halotolerantes de la Laguna de Salinas de San Martín-Perú, para su experimentación solo consideró las colonias que presentaron características morfológicas diferentes, dicho aspecto se tomó en cuenta para determinar las colonias ideales en el presente estudio.

Según Araya (2012), la caracterización morfológica de bacterias y hongos a través de características visibles, como el color, tamaño, forma, es una manera de dividir en grupos similares. A su vez Zuñiga (2009), indica que muchas especies pueden presentar morfología celular similar de acuerdo a las condiciones ambientales o a la etapa de desarrollo en que se encuentren. También Meseguer (2004), indica que macroscópicamente muchos géneros de halobacterias presentan coloraciones desde purpuras, rojizas, naranjas y amarillentas. Aspectos como los que presentan Zuñiga (2009) y Meseguer (2004) fueron tomados en cuenta en esta investigación para la selección de las cepas. Granados, (2003), indica que tras el período de incubación estimado como el adecuado en el medio de cultivo sólido, lugar donde se realizó la siembra deberán aparecer pequeñas masas visibles a simple vista y que estas fueron formadas por el crecimiento en el punto de una célula bacteriana.

En la **Fig. N° 24**, se observa que la cepa proveniente de la piedra blanca (CMB-N), presentó colonias naranjas, siendo cepas planas de textura rugosa y seca en la superficie del medio.



Fig. N°24. Cultivo en medio PTYG de cepa CMB-N.

En la **Fig. N°25**, la cepa proveniente de la piedra verde (CMV-E), presentó colonias aisladas de color amarillo intenso, grandes, elevadas y cremosas.



Fig. N°25. Cultivo en medio PTYG de cepa CMV-E.

En la **Fig. N°26**, la cepa proveniente de la piedra café mostró colonias blancas redondas, planas y pequeñas, dispersadas en la superficie del medio de cultivo.



Fig. N°26. Cultivo en medio PTYG de cepa CMC-E.

Aunque la morfología no es definitiva, pero es una característica que dirige el diagnóstico hacia un grupo más o menos amplio de microorganismos. Hay colonias muy singulares, las cuales presentan colores y texturas particulares casi exclusivas para determinadas especies como es el caso de *Tiobacillus spp.* que presenta coloraciones pardas rojizas y son indicadores de la presencia de metales ferrosos en lechos acuáticos, estas a su vez en medios de cultivos muestran características de crecimiento y formación de colonias redondeadas y algo cremosas. (Preparadores, 2010). En esta investigación el aspecto de las colonias fue de gran ayuda en la identificación. Cada bacteria creció de manera particular,

formando colonias de distinto color, forma, tamaño, textura, brillo, etc. se consideró estos parámetros como indicadores iniciales para la selección de bacterias y conducirla hacia la obtención de cepas ideales.

4.4.2. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS

a) OBSERVACIÓN DIFERENCIAL DE LAS MUESTRAS:

En la **Fig. N°27**, a través de la coloración de Gram de cepas provenientes de la muestra CMB-N, se observó bacterias Gram positivas, redondas y ligeramente alargadas.

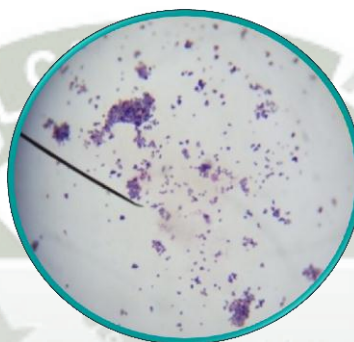


Fig. N°27. Observación 100 x, Coloración de Gram; muestras CMB-N.

En la **Fig. N°28**, correspondiente a CMV-B, se observó bacterias Gram-negativas, alargadas de forma bacilar y rectas.

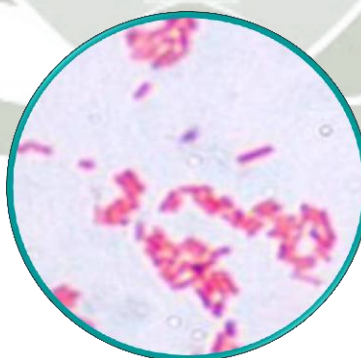


Fig. N°28. Observación 100 x, Coloración de Gram; muestras CMV-B

En la **Tabla N°18** se presenta un resumen de las bacterias identificadas según coloración de Gram.

Tabla N°18. Cuadro resumen de identificación diferencial GRAM

CUADRO RESUMEN			
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CÓDIGO DE CEPA	COLORACIÓN DE GRAM	PRESUMIBLE
PIEDRA BLANCA	CMB-N	<i>Positiva</i>	<i>Bacteria</i>
PIEDRA VERDE	CMV-B	<i>Negativa</i>	<i>Bacteria</i>
PIEDRA CAFÉ	CMC-E	<i>Ambigua</i>	<i>Levadura – hongo</i>

En el estudio de Garza, (2005), este encontró un porcentaje alto de bacterias halófilas Gram positivas cercano al 65% y en el caso de las Gram negativas tan solo alrededor de 30 %, así mismo, un número mínimo de levaduras, con capacidad tolerante a la salinidad. En este estudio se obtuvo un tipo diferente de cepas tomando en cuenta la coloración Gram y teniendo como referencia el estudio antes mencionado es que podemos encaminarnos hacia la clasificación de bacterias halófilas.

4.5. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO:

Para realizar los tratamientos con la finalidad de conocer las condiciones óptimas de crecimiento de las cepas aisladas se realizó en tres procedimientos consecutivos, dependientes uno del otro. Se inició determinando la salinidad óptima.

Para evaluar el crecimiento se utilizó los criterios de “Alto, Medio, Bajo y No Creció” respectivamente, teniendo en cuenta que:

- Alto: cuando creció el toda la secuencia de la estría.
- Medio: cuando el crecimiento fue disperso y discontinuo en la estría.
- Bajo: cuando el crecimiento fue tenue y separado en la estría.
- No creció: cuando no se observó crecimiento alguno en la estría.

La condición óptima de crecimiento más importante para poder afirmar que las cepas aisladas son halófilas o si pertenecen a alguna clasificación es la concentración salina que soportaron.

Pero también la temperatura es una característica muy importante puesto que la temperatura óptima determina que la experimentación se ha efectuado cuando las reacciones metabólicas son catalizadas por enzimas y originan su máxima tasa posible de reacción.

Con respecto al pH, es otro factor importante puesto que si en la experimentación se producen cambios violentos de esta condición, podría afectar la membrana y al transporte de solutos e inhibir enzimas.

Caimanque, (2006), en sus estudios determinó que factores como pH en bacterias halófilas, son importantes para poder mantener la resistencia a la salinidad.

4.5.1. FACTOR: SALINIDAD.-

Según la clasificación de Kusher y Kamekura (1988), están cepas son consideradas como *Halófilas Moderadas*. Los datos detallados se muestran en la **Tabla N°19**.

Tabla N°19. Tabla de resultados de las condiciones óptimas respecto a la SALINIDAD a diferentes rangos de tratamiento.

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CÓDIGO DE CEPA	PORCENTAJE DE CRECIMIENTO		VARIACIONES DE % DE SALES						
		ÓPTIMO	EXTREMO	0.7%	1%	3%	5%	7%	9%	12%
PIEDRA BLANCA	CMB-N	7%	Hasta 9 %	BAJO	MEDIO	MEDIO	ALTO	ALTO	MEDIO	NO CRECIÓ
PIEDRA VERDE	CMV-B	7 %	Hasta 7 %	MEDIO	MEDIO	MEDIO	ALTO	ALTO	NO CRECIÓ	NO CRECIÓ
PIEDRA CAFÉ	CMC-E	7%	Hasta 12 %	MEDIO	MEDIO	MEDIO	ALTO	ALTO	MEDIO	BAJO

De acuerdo a los datos obtenidos el mejor crecimiento se tuvo a 5% y 7% de salinidad en el medio, esta fue la concentración de sales o porcentaje en el cual las bacterias desarrollaron un crecimiento alto y significativo.

4.5.2. FACTOR: *pH*.-

El crecimiento adecuado para las cepas seleccionadas fue a pH 7. Los datos detallados se muestran en la *Tabla N°20*.

Tabla N°20. Resultados para condiciones óptimas de pH

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CODIGO DE CEPA	pH		
		4	7	9
PIEDRA BLANCA	CMB-N	<i>NO CRECIÓ</i>	<i>ALTO</i>	<i>ALTO</i>
PIEDRA VERDE	CMV-B	<i>NO CRECIÓ</i>	<i>ALTO</i>	<i>BAJO</i>
PIEDRA CAFÉ	CMC-E	<i>NO CRECIÓ</i>	<i>ALTO</i>	<i>NO CRECIÓ</i>

La acidez o alcalinidad de un medio influye sobre el crecimiento microbiano, algunos microorganismos se desarrollan mejor a pH alto es decir entre 9 y 14 siendo denominados *alcalófilos*, mientras que otros se desarrollan a pH bajo es decir entre 2 y 5 denominados *acidófilos*, entonces estos rangos pueden variar debido a la adaptabilidad de las cepas.

La cepa CMB-N, presentó un crecimiento alto a pH de 7 y 9, pero se decidió trabajar con la neutralidad.

La cepa CMV-B, presentó un crecimiento óptimo en la neutralidad a pH de 7 y valores de *No Creció* y *Bajos* a pH de 4 y 9.

La cepa CMC-E presentó un crecimiento óptimo a la neutralidad a pH de 7 y no reportó crecimiento en la acidez (pH de 4) ni en la alcalinidad (pH de 9).

De acuerdo a los datos obtenidos se tiene que las cepas aisladas son neutrófilos y una presenta adaptabilidad a medios neutros como alcalinos.

4.5.3. FACTOR: TEMPERATURA.-

Se determinó que la temperatura en la cual el crecimiento microbiano fue ideal y estable fue a 37°C. Se tuvo en consideración que estas bacterias en su medio natural soportan temperaturas de hasta 55°C en las horas de mayor incidencia solar. Los datos detallados en la **Tabla N°21**.

Tabla N°21. Tabla resumen de resultados a diferentes pH y temperatura

PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	CODIGO DE CEPA	TEMPERATURA °C			
		4 °C	25 °C	37 °C	55 °C
PIEDRA BLANCA	CMB-N	NO CRECIÓ	BAJO	ALTO	NO CRECIÓ
PIEDRA VERDE	CMV-B	BAJO	ALTO	ALTO	BAJO
PIEDRA CAFÉ	CMC-E	BAJO	ALTO	ALTO	NO CRECIÓ

Según el estudio de Gonzáles-Hernández (2002), este al evaluar las estrategias de adaptación de microorganismos halófilos, señala que la temperatura juega un papel importante en el desarrollo de mecanismos de producción y acumulación de metabolitos. En nuestro estudio se tuvo en cuenta dichas variantes y es por ello que se decidió trabajar con el valor que presentaban concordancia y así no esforzar a que las cepas conlleven un período de adaptación al medio puesto que se podrían perder alguna característica.

Después de realizar los análisis para determinar condiciones óptimas de crecimiento y considerando los parámetros físicos de salinidad, temperatura y pH se tiene que las mejores condiciones en las cuales se desarrollan las cepas son: para el porcentaje de salinidad 7%, pH de 7 y temperatura óptima a 37°C.

Las cepas CMB-N, CMV-B y CMC-E son clasificadas como *Halófilas Moderadas*, *Neutrófilas* y *Mesófilas*.

4.6. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS HALÓFILAS.-

En la Tabla N°22, se presenta los resultados de las pruebas bioquímicas utilizados para la identificación de las cepas bacterianas halófilas.

Tabla N°22. Pruebas Bioquímicas para las cepas en estudio.

MEDIO DE CULTIVO - CEPA	CMB-N	B-CMV
AGAR SANGRE	NO HEMOLÍTICO	HEMOLISIS
GRAM	GRAM POSITIVO	GRAM NEGATIVA
CATALASA	POSITIVO	POSITIVO
AGAR MC CONKEY	POSITIVO	NEGATIVO
TSI	NEGATIVO	K/K (SH ₂)-
OF	NEGATIVO	+/-
LIA	NEGATIVO	NEGATIVO
INDOL	NEGATIVO	NEGATIVO
ROJO DE METLO	NEGATIVO	NEGATIVO
VOGES PROSKAWER	NEGATIVO	NEGATIVO
UREA	NEGATIVO	POSITIVO
CETRIMIDE	NEGATIVO	POSITIVO
LOFFTER	POSITIVO	NEGATIVO
GÉNERO	<i>Corynebacterium spp</i>	<i>Pseudomona aureginosa</i>

Terminadas estas pruebas, se decidió dar por finalizada la investigación con la cepa CMC-E, puesto que se querían aislar cepas bacterianas, considerando que el objetivo final del trabajo es sobre metales pesados cuya incidencia y toxicidad es alta y dañina. Es por ello

que dejamos como alternativa de investigación a las levaduras halófilas aisladas de la especie conocida *Sacharomyces spp.* Ya que según el estudio de Meseguer (2004) este indicó que existen especies de levaduras y hongos halotolerantes, pero en menor número que las bacterias halófilas y por consiguiente no se tiene información sobre su mecanismo de acción en la remoción de metales pesados.

4.7. DETERMINACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO:

Las cepas competentes se seleccionaron en los procedimientos anteriores, la curva de crecimiento se realizó por duplicado y un blanco, teniendo un promedio por hora, así fue como se determinó la curva de crecimiento. Se detalla los datos de absorbancia en la **Tabla N°23**.

Tabla N°23. Tabla de Absorbancias de las cepas CMB-N y B-CMV

CEPA CMB – N				CEPA B-CMV			
MUESTRA	ABS NETA	MUESTRA	ABS NETA	MUESTRA	ABS NETA	MUESTRA	ABS NETA
HORA 0	0.108	HORA 16	0.406	HORA 0	0.065	HORA 14	0.619
HORA 2	0.095	HORA 18	0.416	HORA 2	0.078	HORA 16	0.783
HORA 4	0.092	HORA 20	0.511	HORA 4	0.085	HORA 18	0.833
HORA 6	0.101	HORA 22	0.654	HORA 6	0.087	HORA 20	0.823
HORA 8	0.099	HORA 24	0.945	HORA 8	0.088	HORA 22	0.129
HORA 10	0.179	HORA 36	0.743	HORA 10	0.112	HORA 24	0.095
HORA 12	0.19	HORA 42	0.572	HORA 12	0.2405	HORA 36	0.087
HORA 14	0.328	-----	-----	-----	-----	HORA 42	0.085

Las condiciones de cultivo de las cepas, en las que presentó mayor eficiencia de crecimiento. Y en las que se realizó esta evaluación fueron de salinidad 7%, temperatura 37°C y pH neutro.

En la **Fig. N° 29**, la cepa CMB-N (*Corynebacterium spp*) tuvo un período de adaptación al medio de cultivo durante las 8 primeras horas, presentando a las horas 16 y 22 un crecimiento exponencialmente alto y se reportó la hora 24 como la máxima de crecimiento hasta su declive en la hora 42 en que se finalizó la experiencia, se ha de tomar en cuenta que la mayoría del tiempo posible se tuvo en agitación para promover el consumo semejante del medio de cultivo en todo el medio y el consumo de los componentes del mismo.

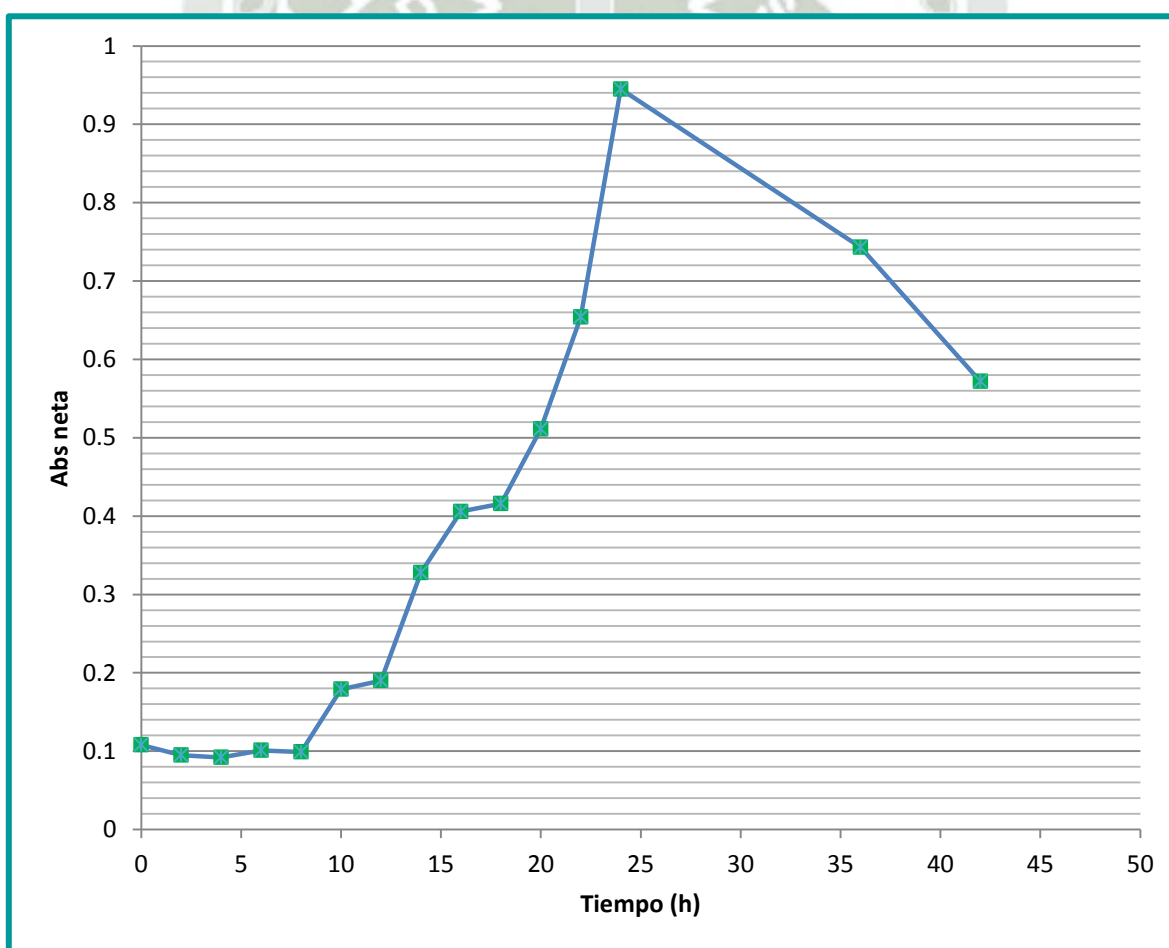


Fig. N° 29. Curva de Crecimiento CMB-N

En la **Fig. N° 30**, corresponde a la curva de crecimiento de la cepa CMV-B (*Pseudomona aeruginosa*) se tuvo que a las 8 horas empieza la fase exponencial, llegando a la fase estacionaria a las 20 horas y a partir de ahí a la fase de muerte.

Resultados similares se obtuvieron en el estudio de Reyes, (2003) en el cual la cepa en estudio *Pseudomona aeruginosa* inmovilizada en alginato, para la degradación de naftaleno presenta resultados de crecimiento favorables a las 16 horas, estamos de acuerdo en la evaluación continua del crecimiento bacteriano.

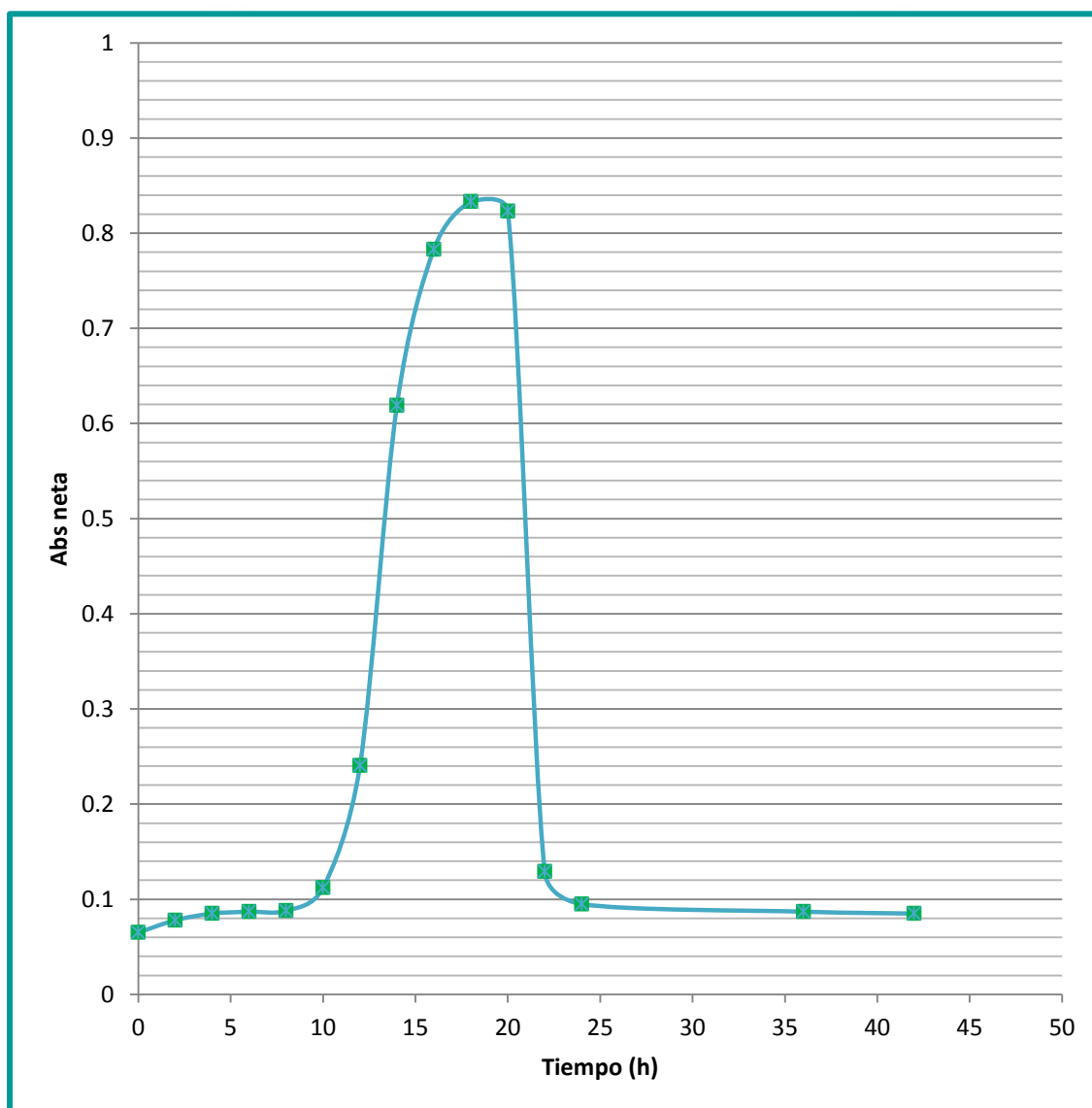


Fig. N°30. Curva de Crecimiento de la cepa CMV-B

4.8. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE Cu (II) Y Cd (II), MEDIANTE INMOVILIZACIÓN EN ALGINATO.-

4.8.1. EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS Cu (II) Y Cd (II).-

a) Remoción de Cu (II) 10 ppm.-

En la **Tabla N° 24**, se muestra los datos, del porcentaje de remoción de Cu (II), para el consorcio conformado por *Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*, desde el día 0 hasta el día 14.

Tabla N°24. Tabla de datos de la remoción de Cu (II) (C0 10 ppm)

Condición: 37 °C y pH 7

TIEMPO (días)	PPM BRUTO	PORCENTAJE DE REMOCIÓN (%)
0	10	0 %
1	8.6	14 %
3	5.3	47 %
5	3.8	62 %
7	0.323	96.77 %
12	0.316	96.84 %
14	0.292	97.08 %

En la **Fig. N° 31.**, se observa la disminución, de la concentración de Cu (II) según los días de evaluación, se tomó en consideración la remoción del consorcio bacteriano y del alginato, debido a esto se realizó la experimentación con una muestra blanco, que presento un valor constante, de 0.2 ppm de Cu (II) de remoción durante toda la prueba. La remoción en el sistema Cu (II) estuvo ligada a las

variaciones del crecimiento celular y su adaptación al medio. También los valores de ppm de Cu, (II) cuya concentración inicial en las muestras de experimentación tuvo un valor de 10 ppm, a partir del día 5 de evaluación se llegó a un ascenso de la capacidad de remoción del sistema alginato-consorcio bacteriano (*Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*), la ligera actividad en los días iniciales se debió a la adaptación de las cepas y aunque la inmovilización en alginato, promueve el crecimiento celular a través de sus cavidades poliméricas (Arroyo, 1998) ,este recién se daría después de un par de días. Comparando nuestros resultados del sistema Cu (II) con una investigación de Manríquez, (2008) donde este, experimento el aislamiento de cepas anaerobias termófilas encapsuladas en alginato y que presentaron resultados favorables a partir de las 48 horas de iniciado el sistema de inmovilización, es que estamos de acuerdo con el periodo largo de adaptación. Pero el descenso final o estabilización, se explicó porque puede presentar toxicidad, o interacciones con los compuestos del mismo medio con el alginato que impedirían llegar a un máximo de remoción.

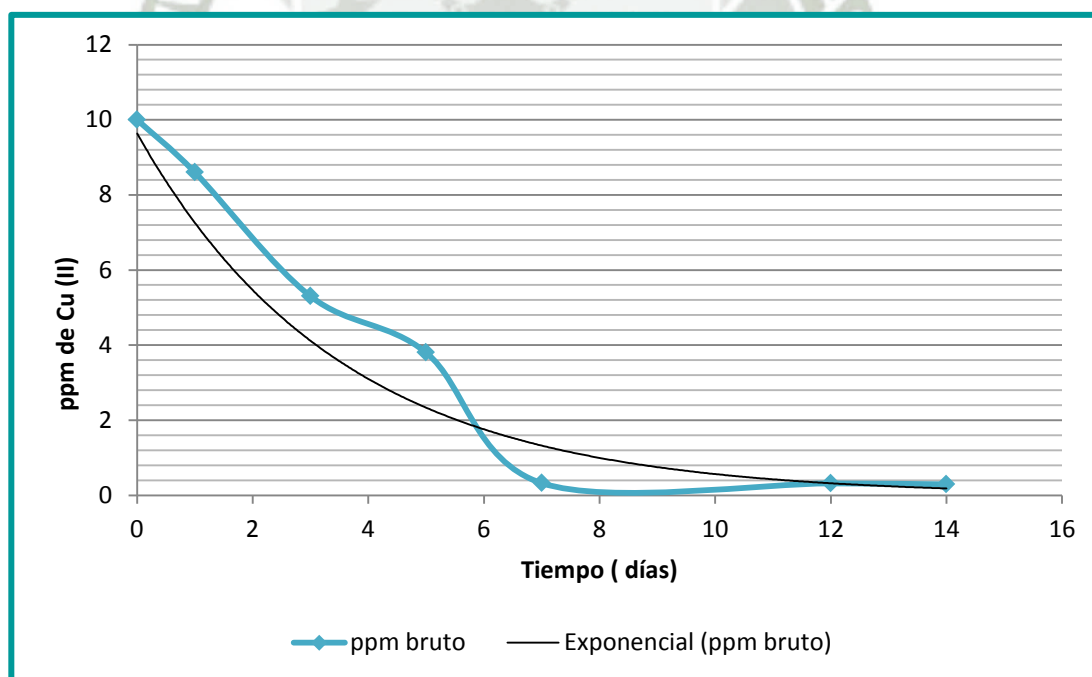


Fig. N°31. Grafica de disminución PPM de Cu (II) a través del tiempo.

Condiciones de C_0 10 ppm y 37°C y pH 7

Existen investigaciones como las de Navarro, (2006) donde este, comparó el efecto del pH, en la biosorción de metales pesados por biomasa inmovilizada, sobre la interacción y afinidad de los biopolímeros, ejemplo alginato, con metales como Cd (II) y Zn (II), que alteraron los resultados de remoción o quizá, se presentaron significativos tanto que compitieron con la acción de la biomasa sobre el metal, tomando en consideración esta observación es que se acordó tomar los valores de la muestra blanco en la presente investigación.

b) Remoción de Cd (II) 10 ppm.-

En la **Tabla N° 25**, se detalla los datos, para la remoción de Cd (II) (C_0 10 ppm), en las condiciones conocidas.

Tabla N° 25. Tabla de datos de la remoción de Cd (II) (C_0 10 ppm)

Condiciones de C_0 10 ppm y 37 y pH 7

TIEMPO (días)	PPM BRUTO	PORCENTAJES DE REMOCION (%)
0	10	0
1	9.3	7
3	7.5	25
5	4.8	52
7	1.92	80.8
12	0.8	92
14	0.1	99

Estos resultados son comparados con el estudio realizado por Kacar, (2002), donde este, confrontó la capacidad de biosorción de biomasa viva y muerta de *P.chrysosporium* inmovilizada en alginato, que obtuvo resultados de remoción 70 mg/L y 40 mg/L respectivamente, mientras tanto el consorcio bacteriano en investigación (*Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*) presentó toxicidad llegando a su fase estacionaria o de muerte al día 7, motivo por el cual, la remoción cesó y al final de la experimentación el ligero aumento se debió en parte a las perlas de alginato, que según los datos del blanco a partir del día 7, presento un ligero aumento. Es por eso que estamos de acuerdo con la observación de que la biomasa muerta presenta poca capacidad de remoción.

La **Fig. N° 32**, es una gráfica que presenta la disminución de la concentración del Cd (II), donde se muestra los valores de ppm de Cd, (II) de concentración inicial, tuvo un valor de 10 ppm.

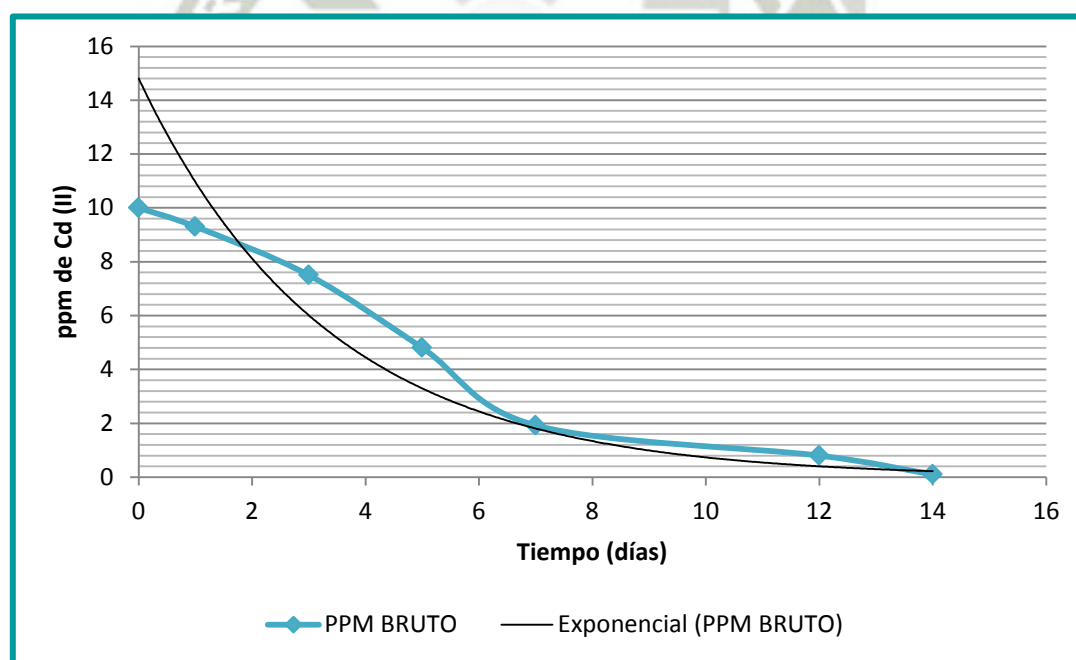


Fig. N° 32. Grafica de disminución PPM de Cd (II) a través del tiempo.

Condiciones de C_0 10 ppm y 37 y pH 7

Se observó que a partir del día 7 de evaluación hay una disminución del metal en el sistema alginato-consorcio bacteriano (*Pseudomona aeruginosa* - *Corynebacterium*

spp.), además que del 7^{mo} al 13^{avo}, día de experimentación aparentemente hay una estabilización de los valores y finalmente la completa remoción. En este caso la muestra blanco, que es el medio PTYG con el metal pesado y las perlas de alginato, mostraron valores mínimos durante toda la experimentación (VER ANEXO 5), es decir, se tuvo una remoción casi exclusiva de las cepas bacterianas.

c) Comparación de remoción de Cu (II) y Cd (II) 10 ppm.-

En la **Fig. N°33**, se tiene la comparación gráfica de los dos procedimientos para Cu (II) y Cd (II) de 10 ppm, se observa que los resultados son similares pero para corroborarlos estadísticamente se efectúan las pruebas en el software *Statgraphics*.

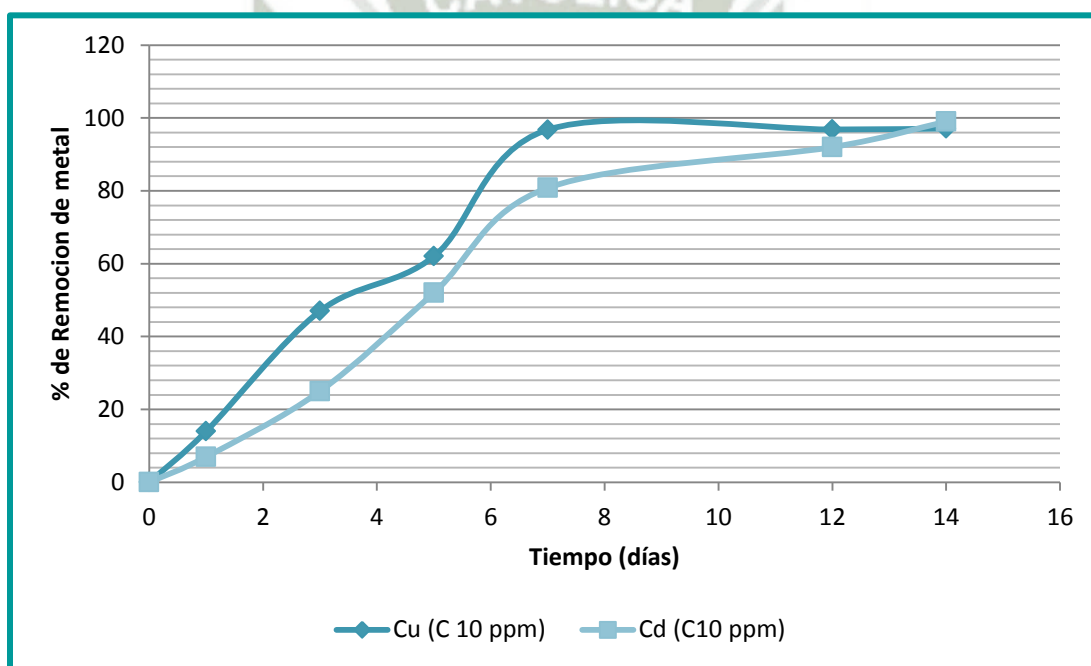


Fig. N° 33. Grafica comparativa de Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de C₀

En el estudio de Garza, (2005), este midió que la remoción de metales pesados como plomo (Pb), cadmio (Cd) y cobre (Cu) con biomasa bacteriana, para el caso de la experimentación bimetálica presentó, valores muy bajos, debido a que en disoluciones de dos metales, hay más competencia entre ellos por los sitios de unión a la biomasa y en el caso del metal en estudio, llegó a una remoción de 96.38 %. Estos resultados se tomaron como referencia para la presente investigación y no se

evaluó la remoción con Cu (II) y Cd (II) en el medio al mismo tiempo, debido a que valores al 97 % de remoción de Cu (II) como único metal en evaluación son ideales.

Los resultados del test T student está diseñado para comparar dos muestras de datos, además a través del programa Statgraphics, suponiendo varianzas iguales: $t = 0.378466$ P-Valor = 0.711695, se determinó que **NO HAY DIFERENCIA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LAS DOS MUESTRAS.**

d) Remoción de Cu (II) 100 ppm.-

En la *Tabla N° 26*, se muestran los datos, del porcentaje de remoción de Cu (II), para el consorcio conformado por *Pseudomona aeuruginosa* y *Corynebacterium spp*, desde el día 0 hasta el día 14.

Tabla N° 26. Tabla de datos de la remoción de Cu (II) (C_0 100 ppm)

Condiciones de C_0 100 ppm y 37°C y pH 7

TIEMPO (días)	PPM BRUTO	PORCENTAJE DE REMOCION (%)
0	100	0
1	95.6	4.4
3	78.9	21.1
5	62.75	37.25
7	56.02	43.98
12	42.3	57.7
14	37.3	62.7

La **Fig. N° 34.**, es una gráfica de la disminución de Cu (II) a través del tiempo. Según, Paknikar, (1999), este demostro que la remoción tiene relación con la variación del pH y el tipo de sorción binaria (dos metales en solución) en un mismo sistema, evaluando esta observación y también que por parte de las cepas del consorcio bacteriano (*Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*) solo fue posible la optimización con un único metal en el medio, no se realizó una experimentación conjunta del Cu (II) y el Cd (II).

En la investigación de Núñez, (2008) este, evaluó la absorción de Cu (II) con perlas de alginato y la remoción con la variación de la Concentración inicial y final, pero optimizó el pH a 5 llegaron a un 87% de remoción, en cambio en esta investigación, por la utilización de las cepas bacterianas (*Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*) y tomando en cuenta que su óptimo de pH fue 7, finalmente a los 14 días de evaluación de este sistema solo se llegó al 62.7 % de remoción global. La diferencia en este caso, es que la concentración de ppm de Cu (II) removido por el alginato de calcio, aumento con respecto al tiempo, permitiendo una mejor respuesta de remoción global.

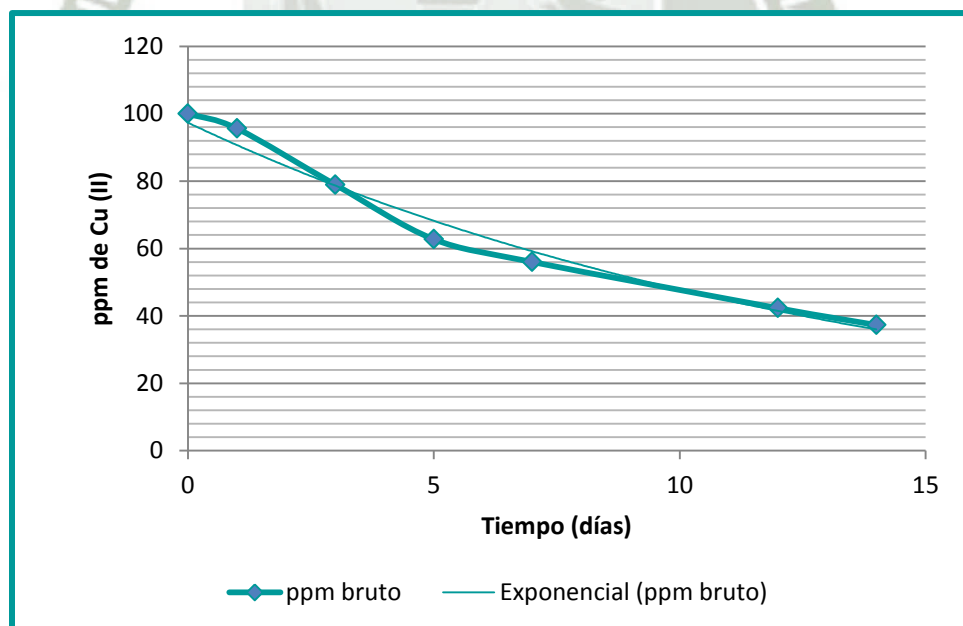


Fig. N° 34. Grafica de disminución PPM de Cu (II) a través del tiempo.

Condiciones de C_0 100 ppm y 37 y pH 7

e) Remoción de Cd (II) 100 ppm.-

En la **Tabla N° 27**, se muestra los datos, del porcentaje de remoción de Cd (II), para el consorcio conformado por *Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*, desde el día 0 hasta el día 14.

Tabla N° 27. Tabla de datos de la remoción de Cd (II) (C_0 100 ppm)

TIEMPO (días)	PPM BRUTO	PORCENTAJE DE REMOCIÓN (%)
0	100	0
1	98.9	1.1
3	97.3	2.7
5	95.2	4.8
7	90.1	9.9
12	89.8	10
14	89.9	10.1

La **Fig. N°35**, es una gráfica que presenta la disminución de la concentración del Cd (II), después del proceso de adaptación, que fue hasta el día 5, en el cual los valores de remoción son bajos, del día 5_{to} al 7_{mo} los valores de remoción del consorcio y el alginato, van en aumento, aunque se esperaba que llegaran hasta un 63 % de remoción final como en el caso del Cu (II) C_0 100 ppm, ya que se llegó en este sistema a un 10.1 %

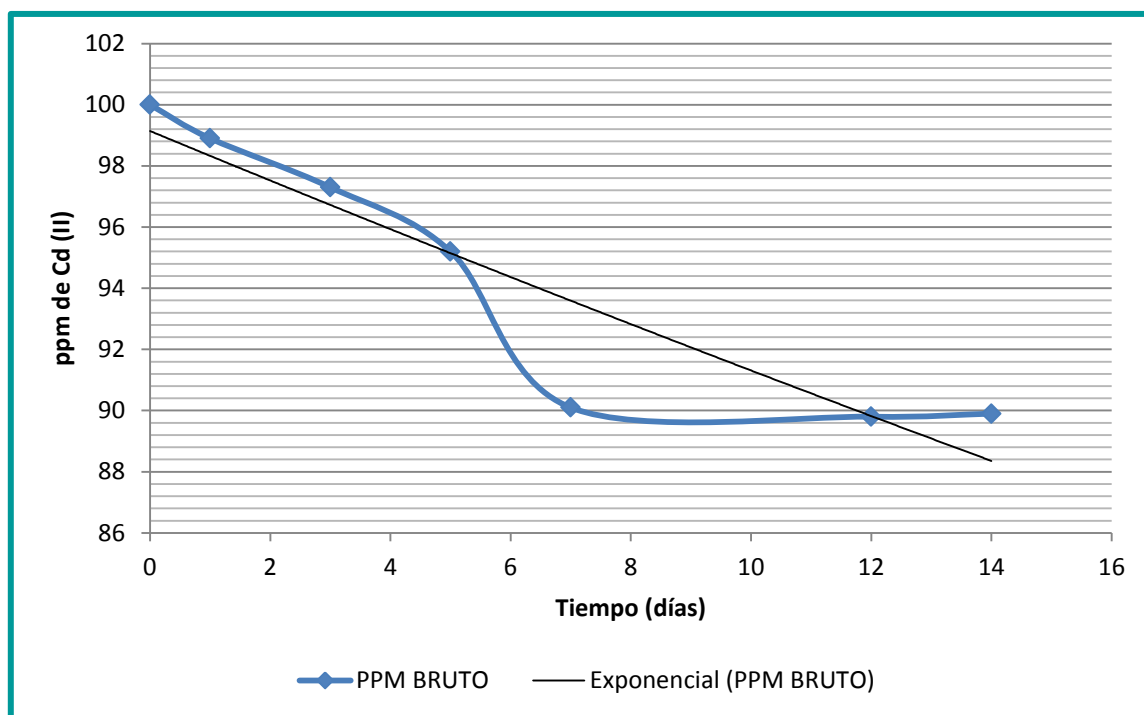


Fig. N° 35. Disminución de ppm de Cd (II) a través del tiempo (días)

Condiciones de C_0 100 ppm y 37 y pH 7.

Algo que se observó en este sistema, es que la viscosidad del medio aumento, porque se visualizaba que la cepa de *Corynebacterium spp*, enturbio el medio, y esto posiblemente vario la viscosidad y el pH, que finalmente hicieron que el metal no se encuentre tan soluble, y no se pudiera realizar la remoción ni por el alginato ni por las cepas. Según Ray, (2001), este indico que el pH, ideal para la solubilidad del Cd (II) en el medio así como la correcta interacción con los grupos carboxilo y fosfato de las células fue 5, estamos de acuerdo con esta observación ya que el pH fue el inconveniente de los resultados finales del sistema Cd (II) 100 ppm C_0 que obtuvieron valores realmente bajos, puesto que finalmente solo las cepas bacterianas removieron 9.89 ppm a los 14 días.

f) Comparación de remoción de Cu (II) y Cd (II) 100 ppm.-

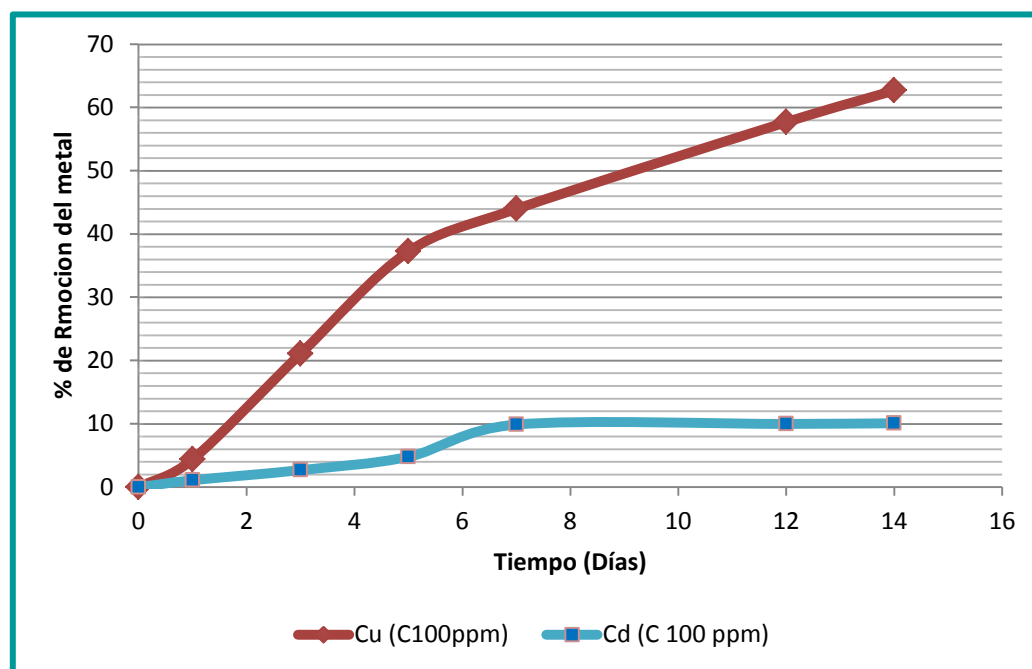


Fig. N°36. Grafica comparativa de Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de C_0

La **Fig. N°36**, es una gráfica comparativa, en la cual se observa que el sistema Cd (II) está muy por debajo de los resultados presentados por el Cu (II), esto se puede explicar porque en realidad el pH, utilizado en el medio de experimentación no es el adecuado. Se llega a esta observación ya que estamos de acuerdo con el estudio de Núñez, (2008), donde este comparó la acción de la remoción a pH 5, obteniendo resultados bajos en soluciones bimetalicas en comparación con los sistemas de un solo metal para lo cual se tomó en consideración y se desistió de hacer una experimentación con dos metales, en el medio. En este mismo estudio también se sugiere que a un pH de 4 la remoción del Cd (II) es efectiva. Aunque para la presente investigación no se evaluó la remoción a pH 4.7 por no ser favorable para el consorcio bacteriano (*Pseudomona aeruginosa* y *Corynebacterium spp*)

A continuación la resolución estadística, que compara las dos sistemas experimentales.

Los resultados del test *T-student* está diseñado para comparar dos muestras de datos. Además a través del *software Statgraphics*, Suponiendo varianzas iguales: $t =$

2.71233 P-Valor = 0.0188738se determinó que **SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.**

TEST DE ANOVA.-

Tratamiento A: Cu de Concentración inicial 10ppm

Tratamiento B: Cu de Concentración inicial 100 ppm

Tratamiento C: Cd de Concentración inicial 10 ppm

Tratamiento D: Cd de Concentración inicial 100 ppm

Hipótesis nula: El resultado porcentual promedio, entre los 4 tratamientos Cu (II) 10 ppm, Cu (II) 100 ppm, Cd (II) 10 ppm, Cd (II) 100 ppm, No tiene diferencia significativa, es decir las cepas realizan la remoción de igual manera, en los 4 sistemas

Hipótesis alternativa: El resultado porcentual promedio, entre los 4 tratamientos Cu (II) 10 ppm, Cu (II) 100 ppm, Cd (II) 10 ppm, Cd (II) 100 ppm, tiene diferencia significativa, es decir las cepas realizan la remoción con diferente capacidad.

El test de ANOVA, compara más de dos tratamientos, que tengan varianzas similares, a través de esta evaluación, se ha llegado a la conclusión que no hay diferencia significativa entre los sistemas de Cu (II) C₀ 10 ppm, Cu (II) C₀ 100 ppm, Cd (II) C₀ 10 ppm, Cd (II) C₀ 100 ppm.

Se realizó a un nivel de 95 % de confianza.

El test ANOVA descompone la varianza de ppm de Metal en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de los grupos. El **F-ratio**, que en este caso es igual a **3.97197**, es el cociente de la estimación entre grupos y la estimación dentro de los grupos. Puesto que el **p-valor** del test F es inferior a 0.05, **hay diferencia estadísticamente significativa entre las ppm de Metal, medias de un nivel de Tratamiento a otro para un nivel de confianza del 95.0%. Se acepta la hipótesis alternativa.**

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Del aislamiento de cepas bacterianas halotolerantes se seleccionó y se obtuvo tres cepas las cuales son *Corynebacterium spp*, *Pseudomona aeruginosa*, *Sacharomyces spp*.
2. Las condiciones de salinidad evaluadas permitieron hallar el porcentaje óptimo para cada cepa, además del pH y temperatura. Tanto para *Corynebacterium spp* y *Pseudomona aeruginosa* se obtuvo salinidad 7%, pH 7 y temperatura 37°C y son consideradas como Halófilas Moderadas, Neutrófilas y Mesófilas.
3. La inmovilización en alginato de calcio, se realizó con el consorcio bacteriano conformado por las cepas aisladas de *Corynebacterium spp* y *Pseudomona aeruginosa*, debido a que presentaban condiciones de crecimiento óptimo y se realizó la experimentación con un solo metal en solución.
4. La capacidad de remoción se evalúa en función de los datos estadísticos, entonces para Cu (II) y Cd (II) (C_0 10 ppm), si hay diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras al 95%, p valor = 0.711695, por lo que la remoción de Cu (II) de C_0 10 ppm con el consorcio bacteriano presentó 97.08 % y para el Cd (II) presentó 99.00%.
5. La capacidad de remoción se evalúa en función de los datos estadísticos, entonces para Cu (II) y Cd (II) (C_0 100 ppm), si hay diferencia estadísticamente significativa entre las dos muestras al 95%, p valor = 0.00270159, y para el caso de Cu (II) presentó una remoción con el consorcio bacteriano de 62.7 %. y para el caso de Cd (II) presentó 10.1 %.

RECOMENDACIONES

- Realizar la caracterización molecular de las cepas del género *Corynebacterium spp.*, para identificar la especie así poder realizar comparaciones con las cepas reportadas.
- Utilizar otros soportes para sistemas de inmovilización, para determinar cuál de ellos presenta mayor viabilidad y respuesta de remoción con estas cepas halotolerantes de *Corynebacterium spp.* y *Pseudomona aeruginosa*.
- Las cepas bacterianas nativas halófilas aisladas pueden ser utilizadas como especies biorremediadoras de efluentes industriales de la región (ríos, relaves mineros, PIRS) que en los últimos reportes han incrementado la cantidad normal de metales pesados permitidos.



BIBLIOGRAFÍA

1. A. Naik, I. (2008). *Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil*.
2. AbouSeoud. (2003). Biodegradation of naphthalene by free and alginate entrapped *Pseudomonas* sp. *Z Naturforsch*, 58((9-10)), 726-31.
3. Agronomos, I. (2005). Practicas Microbiologia General. En *Microbiología General*.
4. Almas. (May-Jun de 2001). Plant uptake of cadmium-109 and zinc-65 at different temperature and organic matter levels. *NCBI*, 30(3), 869-77.
5. Appelo
6. Araya. (2012). *Aislamiento e Identificación Morfológica de Microorganismos que viven en el hogar*.
7. Arroyo. (1998). *Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones*.
8. ATSDR. (9 de 2012). *Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades*. Recuperado el 25 de 11 de 2013, de Resumen de Salud Pública Cadmio: http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs5.pdf
9. Aulacio, M. P. (2008). *Cátedra de Microbiología*. Facultad de Farmacio UCV.
10. Autoridad Nacional del Agua, A. (2012). *Monitoreo de la Calidad de Agua Cuenca Quilca-Chili-Arequipa*.
11. Britanialab. (2010). <http://www.britanialab.com.ar>. Obtenido de Laboratorios Britania: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/sangreagarbase.htm>
12. Brock. (2004). Crecimiento Bacteriano. En M. P. Madigan, *Biología de los microorganismos* (10 ed.). Prentice Hall.: Prentice Hall.
13. Brock, F. (2008). Cultivo de microorganismos. En *Biología de los microorganismos* (8va ed.).
14. BVS, P. d. (2012). *Biblioteca virtual em saúde*. Recuperado el 15 de Julio de 2013, de <http://bvshalud.org/>

15. Caimanque. (2006). *Factores que afectan a los microorganismos*. DuocUC.
16. Carrillo, L. (2003). Vida y muerte de los microorganismos . En *Microbiología Agrícola*.
17. Casal, A.E., Castillo, J.M., Luque, C.J. & Figueroa, M.E., 2003. Influence of Salinity on Germination and Seeds Viability of Two Primary Colonizers of Mediterranean Salt Pans. *Journal of Arid Environments* 53: 145-154.
18. Castillo. (2005). En *Biotechnología Ambiental* (pág. 591). Madrid: Tebar,S.L. .
19. Castro, L. (2011). Aislamiento Y Caracterización De Microorganismos Halófilos De Suelos Salinos De Cuatro Ciénegas Coahuila, México. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 3(5), 33-43.
20. Chen. (2004). *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil in the west of China. *NCBI*, 77982.
21. Clausen. (2000). Isolating metal-tolerant bacteria capable of removing copper, chromium, and arsenic from treated wood. *Waste Manage Resource*, 18, 264-268.
22. Cohen. (2001). Biofiltration-The treatment of fluids by microorganism immobilized. *Bioresource technology*. 77:257-274.
23. Collins, M. D. (1986). Genus *Corynebacterium* Lehmann and Neumann. (B. W. Wilkins, Ed.) *In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2, 1266–1276.
24. Comisión Chilena del Cobre. (2013). *Cochilco*. Recuperado el 2013, de <http://www.cochilco.cl/quienes/>
25. Cooper. (1979). Analysis of corynomycolic acids and other fatty acids produced by *Corynebacterium lepus* grown on kerosene. *J. Bacteriol*, 795-801.
26. Couto, S. (2006). Industrial and biotechnological application of laccases. *A review. Biotechnology advances*, 500-513.
27. DIGESA. (Marzo de 2012). Plan de Trabajo de Vigilancia y Control de Riesgos por exposición ocupacional a metales pesados. Lima, Peru.

28. Ensayos Bacterias Halofilicas. (2010). *Bacterias Halofilicas O Halofilas*. Obtenido de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Bacterias-Halofilicas-o-Halofilas/614961.html>.
29. EPA. (15 de Julio de 2013). *Enviroment Protection Agency*. Recuperado el 15 de Julio de 2013, de <http://www.epa.gov/>
30. Etxberria
31. FAO. (2010). Calidad del Agua en la Agricultura. *Riego y Drenaje*, 20-23.
32. Fergusson. (1990). *The Heavy Elements, Chemistry, Enviromental Impact and Health Effect*. Pergamon Press.
33. Fernández Linares, L. C. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Distrito Federal, México.
34. Field, J. (2006). *Bioremediacion de Metales Pesados*. Universidad de Arizona, Ingenieria Quimica y Ambiental.
35. Flores-Fernandez. (2010). Bacterias Halotolerantes con actividad Lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana San Martin. *Ciencia e Investigacion*, 13(2), 87-91.
36. Fotolog, I. (2013). *Fotolog*. (R. Cuarzo, Editor) Recuperado el 2013, de Blog de cuarzo: http://www.fotolog.com/ricardocuarzo/22864028/#profile_start
37. Gadh. (1993) Microbial treatment of metal pollution: a working biotechnology trend biotechnol. 11:353-359.
38. Galazo. (1990), Growing *Saccharomyces cereviceae* in calcium-alginate beads induce cell alterations, which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biothecnology & bioengineeing*. 36:417-426.
39. Garcés (2010). Recuperación de suelos acidificados y contaminados por minería metálica: ensayos en columnas. 137-160.

40. Garza. (2005). *Alta Capacidad de Microorganismos para remover, Pb (II), Cd (II), Cr (II), Zn (II) y Ni (II)*. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Laboratorio de Biotecnología, Habana.
41. Gonzáles-Hernández, J. C. (July-December de 2002). Estrataegias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3-4), 137-156.
42. Granados, R. (2003). *Microbiología* (1° ed.). España: Paraninfo.
43. Graterol.
44. Harley y Klein. (2009). *Microbiología* (7ª ed.).
45. INEI. (2012). *Perú: Anuario de estadísticas ambientales 2012*. Dirección Técnica de Demografía e Indicadores Sociales.
46. INEI. (febrero, 2013). *Estadísticas Ambientales*. Lima.
47. Kaifer. (2006). *Tratamientos Fisico-Químicos de Residuos*. EOI, Maestría de Ingeniería y Gestión Ambiental.
48. Kamekura, K. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. (E. b. Rodriguez, Ed.) *In Halophilic Bacteria*, 1.
49. Karel, S. (1985). The immobilization of whole cells engineering. *Chemical Engineering Science*, 1321–1354.
50. Keddie, R. M. (1977). The cell wall composition and distribution of free mycolic acids in named strains of coryneform bacteria and in isolates from various natural sources. *J Appl Bacterio*, 42, 229–252.
51. Kourkoutas. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverage production: a review. *Food microbiology*. 21:377-397.
52. Lopez, L. (2012). *Fitorremediación*. Pontificia Universidad Javeriana, Microbiología Ambiental.
53. Madigan. (2004). Diversidad metabólica. En *Biología de los Microorganismos*. España: Pearson Educacion S.A.

54. Manohar. (2001). Enhanced degradation of naphthalene by immobilization of *Pseudomona* sp. strain NGK1 in polyurethane foam. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55(3), 311-6.
55. Manriquez, U. R. (2008). *Aislamiento de Cepas Anaerobias Termofílicas productoras de celulasas y Hemicelulasas, provenientes de la región altiplánica de Bolivia, implicadas en la producción de etanol mediante técnicas de cultivo y aislamiento tradicionales y no tradicionales.* La Paz.
56. Margesin R., F. G. (2002). Cold adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*, 2, 871-885.
57. Mariana, V. L. (2012). *Recuperación de metales preciosos por electrólisis, de efluentes de la industria de convertidores catalíticos.* Universidad de Guanajuato. Memoria de Veranos de la Investigación Científica UG 2012.
58. Martín., G. A. (2010). *Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos.* Laboratorio de Diagnóstico Clínico.
59. Mata. (2006). *Caracterización de los exopolisacáridos producidos por microorganismos halófilos pertenecientes a los géneros Halomonas, Alteromonas, Idiomarina, Palleronia y Salipiger.* Universidad de Granada, Tesis Doctoral; ISBN: .
60. Meseguer. (2004). *Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología.* (Vol. 7). Ciencia e investigación.
61. Ministerio de Agricultura, P. y. (2006). Control de Salinización de suelos y Aguas y Recuperación de Suelos Salinos. Madrid: Regadíos Center.
62. MINSA. (2013). *Dirección General de Salud de las Personas.* Recuperado el 2013, de www.minsa.gob.pe: http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=3
63. Monem. (1998). Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. 40, 59-66.

64. Morales D, R. K. (2008). *Determinacion de la capacidad de remocion de cadmio,plomo y niquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados*. Bogota: Tesis.
65. Moreno, L. (1995). La contaminacion y sus Efectos en la Salud y el Ambiente. En L. Moreno, *Centro de Ecologia y Desarrollo*.
66. Navarro. (2006). Elucidacion del efecto del pH en la adsorcion de metales pesados mediante biopolimeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Revista Iberoamericana de Polimeros*, 7(2), 113-126.
67. Nieto, J. F.-C. (1993). Survey of antimicrobial susceptibility of moderately halophilic eubacteria and extremely halophilic aerobi archaeobacteria. *16*, 352-362.
68. Núñez, A. (2008). *Determinación de metales pesados (aluminio, plomo, cadmio y níquel) en rábano (Raphanus sativus L.), brócoli (Brassica oleracea L. var. italica) y calabacín (Cucurbita pepo L. var. italica)*. FCB, UANL, Laboratorio de Química Analítica, Mexico.
69. O'reilly, K. (1989). Kinetics of p-Cresol degradation by an immobilized Pseudomonas. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4), 866-870.
70. OMS. (2002). *Salud Ambiental Basica* (Vol. 19). Mexico DF: Oficina Regional para America Latina y el Caribe.
71. OMS. (2004). Guías para la calidad del agua potable. *1*(3).
72. OMS. (2013). *Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica*. Washington .
73. Paknikar. (1999). Development of microbial biosorbents- a need for standardization of a experimental protocols. in. En K. Paknikar, *Biohydrometallurgy and The Environmet Toward the Mining* (págs. 362-372).
74. Palleroni. (2005). Pseudomonas. En *Manual of Systematic Bacteriology* (2 ed., Vol. 2, págs. 323-379). Springer- Verlag.

75. Park. (2000). Purification to Homegeneity and Characterization of a Novel Pseudomonas Putida Chromate Reductase. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1788-1795.
76. Piedras decorativas. (2007). *Piedras decorativas*. Recuperado el 24 de 11 de 13, de Enciclopedia Encarta on line: <http://www.piedrasdecorativas.cl/cristales-cuarzo.htm>
77. Pérez, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. En M. Mota, *Temas De Bacteriología Y Virología Médica* (págs. 23-41).
78. Preparadores. (2010). Preparadores de oposiciones para enseñanza. 1-20.
79. Quero Consulting SC. (2013). *Portal de Silicio en los Sistemas Biológicos*. Recuperado el 09 de 2013, de <http://loquequero.com/portal/index.php>
80. Rahman. (2006). Biodegradation of Hydrocarbon Contamination by Immobilized Bacterial Cells. *J.Microbiol*, 354-359.
81. Rajeshwar. (1994). *J.of Appl. Electrochem*, 24, 1077-1091.
82. Ramírez. (2004). Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Sociedad Veezolana de Microbiologia*, 4(1-2).
83. Ramirez N, S. J. (Julio-septiembre de 2006). Microorganismos extremofilos, Actinomicetos halofilos en Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 37(3), 56-71.
84. Ramírez, A. (2002). Toxicología del cadmio. Conceptos actuales para evaluar exposición ambiental u ocupacional con indicadores biológicos. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(1), 51 - 64.
85. Ray. (2001). Chem.Eng. En A. Ray.
86. Reyes. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierias*, IX(31), 59-64.
87. Rios, N. V. (1998). Numerical taxonomy of heavy metaltolerant nonhalophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Int Microbiol*, 1, 38-44.

88. Romero, G. y. (8 de Noviembre de 2008). *Revista de la Sociedad Española de Mineralogía*(10), 48-60.
89. Rouessac. (2000). *Métodos y técnicas instrumentales modernas-Análisis Químicos*. Granada, España: Mc Graw Hill.
90. Sanchez. (2004). Proteasas extracelulares producidas por bacterias marinas aisladas de aguas contaminadas con efluentes pesqueros. *Peru biol*, II(2), 179186.
91. Sastoque. (2005). *Aislamiento y Selección de Microorganismos Productores de Quitinasas a partir de residuos de concha de camarón*. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
92. Soria, I. M. (2004). *Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología*. Departamento de producción vegetal-Universidad Miguel Hernandez de Elche, Ciencia e Investigación , Alicante.
93. Soto. (14 de 7 de 2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova- Publicacion Científica en Ciencias Biomédicas*, 121-240.
94. Stewart. (2003). Diffusion in Biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485-1491.
95. Téllez, M. (2008). *Laboratorio de equilibrio y cinética*.
96. Tortora. (2007). *Introducción a la Microbiología* (9° ed.). Buenos Aires: Medica Panamericana.
97. Triviño, A. R. (2011). Manual de Microbiología General. En U. N. Colombia, *Conceptos y Práctica De Microbiología General* (págs. 3-161). Colombia.
98. UAM. (2010). *Museo Virtual*. Recuperado el 25 de 11 de 2013, de Fundamentos de Nutrición el Cobre: <http://www.uam.es/docencia/museovir/web/Museovirtual/fundamentos/nutricion%20mineral/micro/cobre.htm>
99. UChile. (1993). *SISIB Ciencias Veterinarias y Pecuarias*. Recuperado el 25 de 11 de 13, de

http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_veterinarias_y_pecuarias/simposio1993/03areaecosistema.html/27a.html

100. UD4. (2009). Muestreo y preparacion de la Muestra . En UD4, *Laboratorio de Analisis y Control de Calidad* .
101. UDEA. (2007). *Microbiología Ambiental*.
102. UGR. (2012). *Practicas online de Microbiología Farmaeutica*. Recuperado el 25 de 11 de 2013, de POMIF:
<http://www.pomif.com/pages/practicas/bacteriologia/tinciones>
103. UNNE. (2010). Volumetria de Precipitación. En *Quimica General y Tecnologica*.
104. Vasquez. (2006). *Control de Isalinizacion de suelos y aguas y recuperación de suelos salinos*. San Fernando de Henares, Madrid.
105. Ventosa, N. (1998). Biology of moderately halophilic aerobicbacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 504-544.
106. Vullo. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interaccion en beneficio del medio ambiente. *Revista Quimica Viva*, 2(3).
107. Wierzchos, J. (2004). Endolithic Cyanobacteria in Halite Rocks from the Hyperarid Core of the Atacama Desert. *Astrobiology*, 6(4), 1-7.
108. Zuñiga. (2009). *Aislamiento e identificacion de Levaduras nativas etanogénicas*. Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educacion, Facultad de Ciencias Básicas , Santiago.

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL DESARROLLO PRÁCTICO

ANEXO 1.-

OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DE CEPAS ELIMINADAS.

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO:

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS.- SALINIDAD:

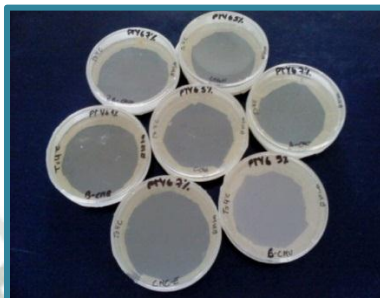


Fig. N°37. Crecimiento de las todas las Cepas aisladas a Temperatura de 4°C.

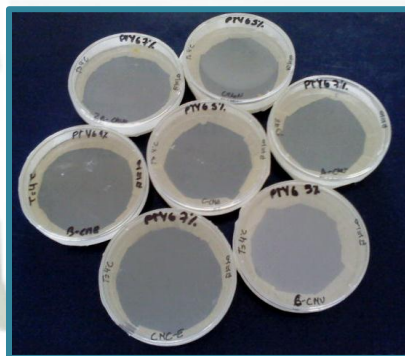


Fig. N°38. Temperatura 55°C de cepas CMB-B, C, E; CMV- A, B Y CMC-B, C.



Fig. N°39. Fotografía de las todas las cepas aisladas, a pH 9, cara frontal e inversa

ANEXO 2.-

EVALUACIÓN DE LA SALINIDAD DEL SUELO EN BASE A LA CONDUCTIVIDAD

Tabla N°28. Ajuste de la conductividad en función de la solución de KCl

Tabla 4.2 Ajuste de conductividad en función de la solución de KCl.

Sol. estándar de KCl	Conductividad eléctrica a 25°C
0.1 N	12.9 dS/m
0.01 N	1.412 dS/m

ANEXO N° 3.-

ESTANDARIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE NITRATO DE PLATA 0,1 N CON CLORURO DE SODIO 0,1 N

- **PARA 0,1 N Nitrato de Plata**

PESO (g)	16.994
Volumen (ml)	1000

- **SOLUCION DE ClNa 0,1N**

Peso (g)	0.585
Volumen (ml)	100

Enrazar 50 (ml) cromato de potasio

5.00%	meq	0.05835
-------	-----	---------

Soluciones de ClNa	solución 1 (ml)	10	Para el cálculo de la Normalidad de NaCl	Volumen (ml) AgNO3 de la titulación	48	Normalidad del ClNa	0.10025707
	solución 2 (ml)	10		Volumen (ml) AgNO3 de la titulación	45	Normalidad del ClNa	0.10025707
	solución 3 (ml)	10		Volumen (ml) AgNO3 de la titulación	46	Normalidad del ClNa	0.10025707
	Promedio					0.10025707	

Normalidad del AgNO ₃ (1)	0.10443445
Normalidad del AgNO ₃ (2)	0.11139674
Normalidad del AgNO ₃ (3)	0.10897508
Promedio	0.10826876

- MEDIDA DE % DE CLORUROS- METODO DE MOHR

$$\%NaCl = \frac{5.85x(gasto)xN}{Masa(g)}$$

	Peso (g)	Gasto de AgNO ₃	Normalidad AgNO ₃	%NaCL
Muestra 1	3.1	0.6	0.108268756	0.12258817
Muestra 2	3.01	0.4	0.108268756	0.08416907
Muestra 3	3.05	0.6	0.108268756	0.12459781

ANEXO 4.- PREPARACION DE SOLUCIONES

- **Preparación de solución de cadmio:**

Se pesó 2.744 g de nitrato de cadmio en la balanza electrónica. En una fiola se diluyó a un volumen de 1000 ml para obtener una concentración de 1000 mg /l. Se almacenó en condiciones adecuadas.

- **Preparación de solución de cobre:**

Se pesó 3.929 g de sulfato de cobre pentahidratado en una fiola y se enrasó a un volumen de 1000 ml para obtener una concentración conocida de 1000 mg/l de cobre. se etiquetó y almacenó en condiciones adecuadas.

ANEXO 5.- INMOVILIZACION BACTERIANA



Fig. N°40. Formación de perlas de alginato en CaCl_2

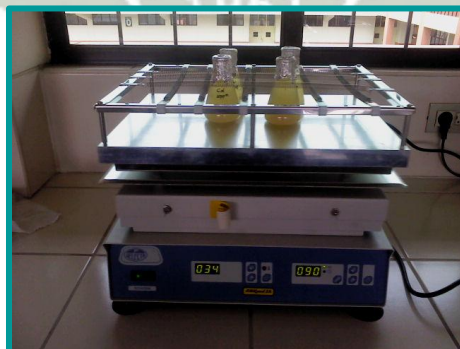


Fig. N°41. Cultivo de consorcios con contaminante en agitación



Fig. N°42. Consorcio en medio líquido de cultivo con contaminante Cd (II) 10 ppm.



Fig. N°43. Consorcio en medio líquido de cultivo con contaminante Cu (II) 10 ppm.

ANEXO 6.-

RESUMEN ESTADISTICO TEST T Student

Para Cu (C₀ 10ppm) y Cd (C₀ 10ppm):

Contrastes t de comparación de medias:

Hipótesis nula: media1 = media2

Hipótesis alt.: media1 <> media2

Suponiendo varianzas iguales: $t = 0.378466$ P-Valor = 0.711695

De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde -39.3402 hasta 55.8802.

Dado que el intervalo contiene el valor 0.0, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras para un nivel de confianza del 95.0%.

El test T, se ha realizado para determinar si la diferencia entre las dos medias es igual a 0.0 frente a la hipótesis alternativa en la que la diferencia no es igual 0.0.

Puesto que el *p-valor* calculado no es inferior a 0.05, no podemos rechazar la hipótesis nula.

NOTA: Estos resultados asumen la igualdad de varianzas en las dos muestras. En este caso, esa asunción parece ser razonable teniendo en cuenta los resultados del F-test para comparar las desviaciones típicas. Puede ver los resultados de este test ubicando la tabla Comparación de Desviaciones Típicas en el Anexo 6

Resumen Estadístico:
Tabla N°29. Para Cu (C_0 10 ppm y Cd C_0 10ppm)

Datos	Tratamiento A	Tratamiento B
Desviación Típica	40.7583	41.0017
Varianza	1661.24	1681.14
GL	6	6
	Muestra 1	Muestra 2
Frecuencia	7	7
Media	59.0986	59.8286
Varianza	1661.24	1681.14
Desviación Típica	40.7583	41.0017
Mínimo	0.0	0.0
Máximo	97.08	99.0
Rango	97.08	99.0
Asimetría Típica	0.51318	-0.0886507
Curtosis Tipificada	-0.863312	-1.14401

Para Cu (C_0 100 ppm) y Cd (C_0 100 ppm):

ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA ENTRE LAS DOS MUESTRAS.

Contrastes t de comparación de medias:

Hipótesis nula: $media1 = media2$

Hipótesis alt.: $media1 <> media2$

De particular interés está el intervalo de confianza para la diferencia entre las medias, el cual se extiende desde 5.12907 hasta 47.0224. Dado que el intervalo no contiene el valor 0.0, existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las dos muestras para un nivel de confianza del 95.0%.

En este caso, el test T se ha realizado para determinar si la diferencia entre las dos medias es igual a 0.0 frente a la hipótesis alternativa en la que la diferencia no es igual 0.0. Puesto que el p-valor calculado es inferior a 0.05, podemos rechazar la hipótesis nula en favor de la alternativa.

NOTA: Estos resultados asumen la igualdad de varianzas en las dos muestras. En este caso, esa asunción es cuestionable puesto que los resultados de un F-tests para comparar las desviaciones típicas sugieren que puede haber diferencia significativa entre ellas.

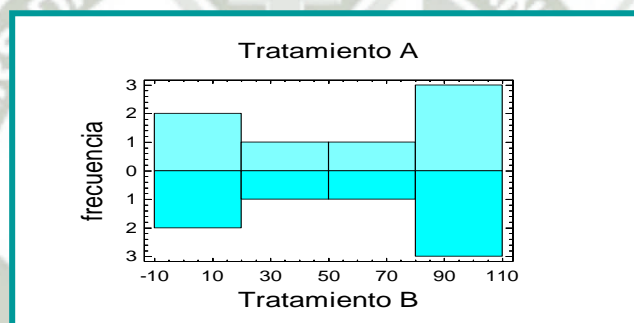


Fig. N°44. Gráficos de Frecuencia para Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de Concentración inicial

En la *Fig. N° 47*, se observan los gráficos de Cajas y Bigotes, y son utilizados para representar la dispersión de las muestras, en la imagen se observa que para todos los tratamientos hay un valor muy similar de promedio que está representado por un asterisco rojo, dentro de las cajas, al menos para los tres primeros tratamientos, lo valores en caso de Cd (C_0 100 ppm), no muestran gran dispersión, y su representación es angosta, no hay variabilidad en este caso.

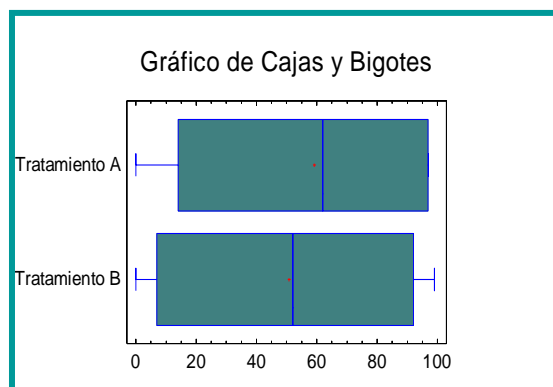


Fig. N°45. Gráfico de Cajas y Bigotes para Cu (II) y Cd (II) 10 ppm de Concentración inicial.

RESUMEN ESTADÍSTICO

Para Cu (C_0 100 ppm) y Cd (C_0 100 ppm):

Tabla N°30. Para Cu (C_0 10 ppm y Cd C_0 10ppm)

	Muestra 1	Muestra 2
Frecuencia	7	7
Media	32.4471	6.37143
Varianza	612.872	34.099
Desviación Típica	24.7563	5.83944
Mínimo	0.0	0.0
Máximo	62.7	16.1
Rango	62.7	16.1
Asimetría Típica	-0.203449	0.701171
Curtosis Tipificada	-0.899125	-0.33827

Resumen del Procedimiento:

Resumen Estadístico de Cu (II) y Cd (II)

Condiciones de C_0 de 100 ppm

	TRATAMIENTO C	TRATAMIENTO D
PORCENTAJE	Se toma en consideración el % de disminución desde 100 ppm de Cu (II) de Concentración inicial	Se toma en consideración el % de disminución desde 100 ppm de Cd (II) de Concentración inicial
VALORES	0.0 hasta 62.7	0.0 hasta 16.1

En la Fig. N°44, se presenta un gráfico de frecuencia se muestran que los valores para Cd (II) y Cu (II) de 10 ppm de concentración inicial, tienen resultados distintos y con gran diferencia a simple vista.

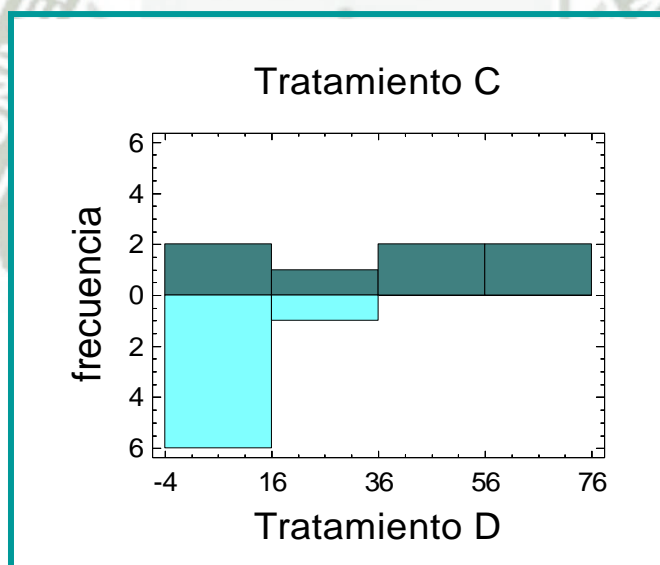


Fig. N°46. Gráficos de Frecuencia para Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de Concentración inicial

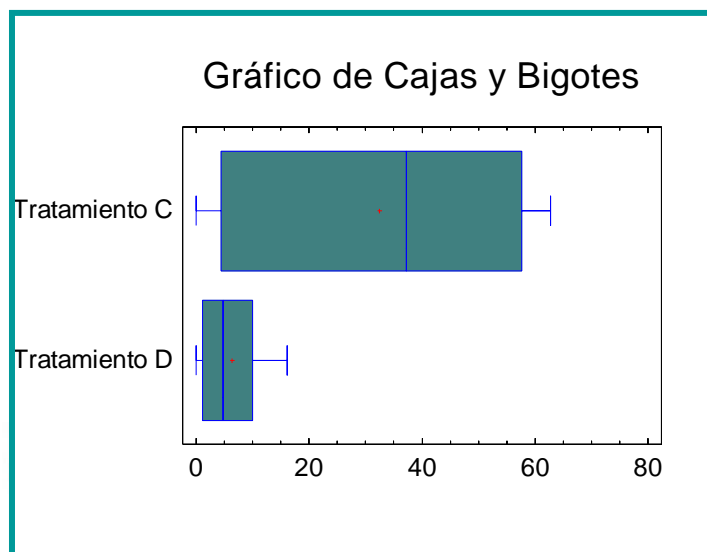


Fig. N°47. Gráfico de Cajas y Bigotes para Cu (II) y Cd (II) 100 ppm de Concentración inicial

En la Fig. N°45, se explica en el detalle de comparación de medias, el punto rojo que se observa en las cajas, es el promedio.

ANEXO N° 7.- RESUMEN ESTADÍSTICO ANOVA:

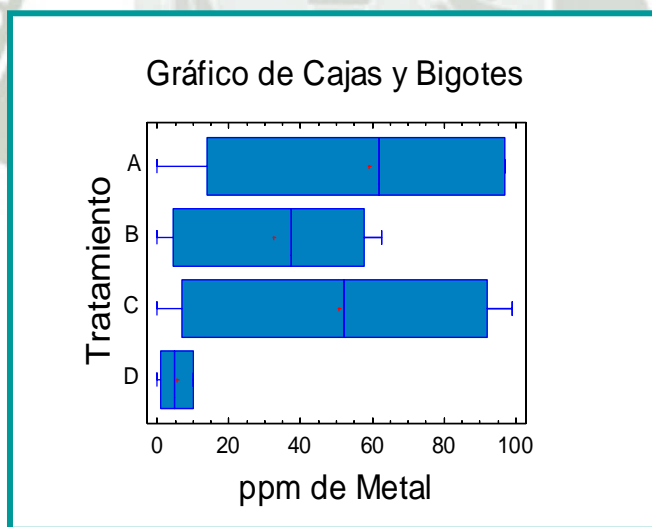


Fig. N°48. Gráfico de Cajas y Bigotes para los 4 tratamientos Cu (II) 10 y 100 ppm Cd (II) 10 y 100 ppm